



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Efecto antioxidante, antitumoral y genotóxico del
extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma
longa* L. “palillo”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Nutrición con
mención en Nutrición Clínica

AUTOR

Martha Francisca COSQUILLO RAFAEL

ASESOR

Dra. Maritza Dorila PLACENCIA MEDINA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cosquillo M. Efecto antioxidante, antitumoral y genotóxico del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo” [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Unidad de Posgrado; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

0000-0002-0342-2116

Código Orcid del asesor o asesores (dato obligatorio):

0000-0003-3624-3461

DNI del autor:

09092775

Grupo de investigación:

FARMACOGNOSIA Y MEDICINA TRADICIONAL UNMSM

Institución que financia parcial o totalmente la investigación:

NO APLICA

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas 12.055129, 77.023203

UNIVERSIDAD CAYETANO HEREDIA: 12.023817, 77.056509

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA: 13.161182, 74.225788

Año o rango de años que la investigación abarcó:

2018-2019



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América




Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado
Sección Maestría

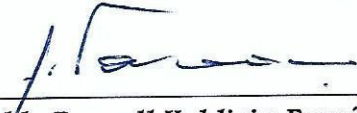
ACTA DE GRADO DE MAGISTER

En la ciudad de Lima, a los 09 días del mes de diciembre del año dos mil diecinueve siendo las 12:00 pm, bajo la presidencia de la Dra. Silvia Suárez Cunza con la asistencia de los Profesores: Dra. Doris Hilda Delgado Pérez (Miembro), Mg. Henry Guija Guerra (Miembro), Mg. Freddy Roynall Valdivia Fernández Dávila (Miembro) y la Dra. Maritza Dorila Placencia Medina (Asesora); la postulante al Grado de Magister en Nutrición con mención en Nutrición Clínica, Bachiller en Farmacia y Bioquímica, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis Titulada: **"EFECTO ANTIOXIDANTE, ANTITUMORAL Y GENOTÓXICO DEL EXTRACTO CRUDO Y ETANÓLICO DEL RIZOMA DE CURCUMA LONGA L. "PALILLO"** con el fin de optar el Grado Académico de Magister en Nutrición con mención en Nutrición Clínica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **B MUY BUENO 17**. A continuación el Presidente del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN NUTRICIÓN CON MENCIÓN EN NUTRICIÓN CLÍNICA** a la postulante **MARTHA FRANCISCA COSQUILLO RAFAEL**.

Se extiende la presente Acta en tres originales y siendo las 01:05 pm, se da por concluido el acto académico de sustentación.


Dra. Doris Hilda Delgado Pérez
Profesora Principal
Miembro


Mg. Henry Guija Guerra
Profesor Auxiliar
Miembro


Mg. Freddy Roynall Valdivia Fernández Dávila
Profesor Principal
Miembro


Dra. Maritza Dorila Placencia Medina
Profesora Principal
Asesora


Dra. Silvia Suárez Cunza
Profesora Principal
Presidente

DEDICATORIA

A mis padres Macedonio Cosquillo Mallaopoma y
Lourdes Rafael Robles

A mis hijos Román y Jesús

A mis hermanos, sobrinos, sobrinos nietos.

A mis amigos de siempre

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Maritza Placencia Medina profesora e investigadora de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su valiosa asesoría y tutoría dedicada a la elaboración del presente trabajo de investigación.

Al PhD Abraham J. Vaisberg Wolach Profesor Principal del Departamento de Microbiología e investigador de la Unidad de Biología Celular y Virología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por su valiosa colaboración en el desarrollo de líneas celulares.

A la Mg. Mónica Guadalupe Retuerto profesora e investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su valiosa colaboración y dedicación en la realización del presente trabajo.

Al Mg. Tomás Miranda Tomasevich y Mg. M. Moreno Hinojosa; profesores e investigadores del Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú, por su valiosa colaboración y dedicación en la realización del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Situación Problemática.....	1
1.2 Formulación del problema de investigación.....	3
1.3 Justificación Teórica.....	3
1.4 Justificación Práctica.....	4
1.5 Objetivos de la Investigación	5
1.5.1 Objetivo General	5
1.5.2 Objetivos específicos	5
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación.....	6
2.2 Antecedentes de investigación	7
2.3 Bases Teórica	9
2.3.1 Descripción Botánica de <i>Curcuma longa</i> L.....	9
2.3.2 Composición química de <i>Curcuma longa</i> L	10
2.3.3 Radicales libre	11
2.3.4 Estrés oxidativo	15
2.3.5 Radicales Libres en Carcinogénesis.....	18
2.3.6 Antioxidantes	21
2.3.6.1 Antioxidantes enzimáticos	22
2.3.6.2 Antioxidante no enzimático.....	25
2.3.7 Determinación de capacidad antioxidante in vitro	26
2.3.7.1 Ensayo DPPH	26
2.3.7.2 Ensayo de captación del radical ABTS.....	27
2.3.8 Genotoxicidad	27
2.3.9 Citotoxicidad	28

2.3.10 Evaluación de la citotoxicidad. Ensayo de sulforodamina B	31
--	----

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	33
3.1 Tipo y diseño del Estudio	33
3.2 Población de estudio	33
3.3 Muestra.....	33
3.4 Material biológico.....	33
3.5 Reactivos	34
3.6 Equipos	34
3.7 Preparación de extractos.....	35
3.7.1 Recolección y preparación de la muestra vegetal	35
3.7.2 Clasificación de la muestra.....	35
3.7.3 Obtención del extracto crudo y extracto etanólico	35
3.7.3.1 Obtención del extracto crudo	35
3.7.3.2 Obtención del extracto etanólico.....	35
3.8 Método experimental.....	36
3.8.1 Evaluación de las Parámetros Fisicoquímicos del extracto crudo y etanólico de la pulpa del rizoma <i>Curcuma longa</i> L.....	36
3.8.1.1 Determinación de la Densidad relativa.....	36
3.8.1.2 Determinación de Sólidos totales.....	37
3.8.1.3 Determinación de Índice de Refracción (IR) y Grados BRIX	37
3.8.1.4 Determinación de pH	37
3.8.1.5 Prueba de solubilidad	37
3.8.2 Tamizaje fitoquímico: Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios.....	38
3.8.3 Determinación de la actividad antiradical libre. Evaluación de la cuantificación de polifenoles totales .	41
3.8.3.1 Determinación de Fenoles Totales. Ensayo de Folin Ciocalteu	41

3.8.3.2	Ensayo de captación del radical DPPH· según (Brand-Williams et al, 1995) con modificaciones	42
3.8.3.3	Ensayo de captación del radical ABTS ⁺ según Re y col.1999	44
3.8.4	Ensayos de genotoxicidad in vitro, “método Tomasevich”	46
3.8.4.1	Fase de cuantificación y preparación de stock de ADN genómico obtenido para el ensayo.....	46
3.8.4.2	Fase de ensayo de genotoxicidad in vitro extracto del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. sobre el ADN genómico humano	46
3.8.4.3	Fase de electroforesis	47
3.8.4.4	Fase de lectura por radiación UV	48
3.8.4.5	Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad.....	48
3.8.5	Bioensayo del efecto antitumoral in vitro.....	49
3.8.5.1	Obtención de las líneas celulares	49
3.8.5.2	Ensayo de citotoxicidad	50
3.8.5.3	Evaluación de la actividad antitumoral.....	51
3.9	Análisis de datos	52
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		53
4.1	Resultados	53
4.1.1	Caracterización fisicoquímica	53
4.1.2	Tamizaje Fitoquímico	55
4.1.3	Cuantificación de polifenoles totales presentes en el extracto crudo y etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.....	57
4.1.4	Efecto antioxidante in vitro del extracto crudo y etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.....	57
4.1.5	Evaluación de la capacidad genotóxica	61
4.1.5.1	Extracto crudo de <i>Curcuma longa</i> L.....	61
4.1.5.2	Extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> L.....	64

4.1.5.3 Estandar Curcumina.....	67
4.1.6 Evaluación de la capacidad antitumoral.....	69
4.1.6.1 Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. y Curcumina sobre la línea celular tumoral DU-145 (adenocarcinoma de próstata).....	69
4.1.6.2 Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. y Curcumina sobre la línea celular tumoral HT-29 (carcinoma de colón).....	70
4.1.6.3 Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. y Curcumina sobre la línea celular normal de ratón 3T3.....	71
4.1.6.4 Determinación de la IG ₅₀	72
4.2 DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	81
RECOMENDACIONES.....	82
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXOS.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.-</i> Criterios para presentar niveles solubilidad de extractos.....	38
<i>Tabla 2.-</i> Determinación de Polifenoles. Método Folin-Ciocalteu	42
<i>Tabla 3.-</i> Determinación del IC ₅₀ de <i>Curcuma longa</i> L. y estándares. Método DPPH.....	43
<i>Tabla 4.-</i> Determinación del IC ₅₀ de <i>Curcuma longa</i> L. y estándares. Método ABTS.....	45
<i>Tabla 5.-</i> Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad in vitro de extracto del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L., sobre ADN genómico humano.....	47
<i>Tabla 6.-</i> Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano, con el extracto del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L., para el ensayo de genotoxicidad in vitro	48
<i>Tabla 7.-</i> Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.....	49
<i>Tabla 8.-</i> Número y concentración de células por pozo	50
<i>Tabla 9.-</i> Resultados de la caracterización fisicoquímica del extracto crudo y etanólico de <i>Curcuma longa</i> L.....	54
<i>Tabla 10.-</i> Resultados del ensayo de solubilidad	55
<i>Tabla 11.-</i> Resultados de Tamizaje fitoquímico del extracto crudo y etanólico de <i>Curcuma longa</i> L “palillo”	56
<i>Tabla 12.-</i> Promedios de IC ₅₀ para DPPH y ABTS de extractos de <i>Curcuma longa</i> L., Curcumina y Trolox.....	60
<i>Tabla 13.-</i> Promedios de la evaluación de la capacidad antioxidante de extractos crudo y etanólico de <i>Curcuma longa</i> L. y curcumina.....	60
<i>Tabla 14.-</i> Coeficiente de Correlación de Pearson (r) del extracto crudo y etanólico de <i>Curcuma longa</i> L	61

Tabla 15.- Valores numéricos del ensayo genotóxico in vitro del extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora 64

Tabla 16.- Valores numéricos del ensayo genotóxico in vitro del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora. 66

Tabla 17.- Valores numéricos del ensayo genotóxico in vitro del estándar curcumina a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora..... 69

Tabla 18.- Valores de IG₅₀ y citotoxicidad del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., curcumina y 5- Fluoro-Uracilo en célula tumoral y normal 73

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.-</i> Curva de calibración del ácido gálico	57
<i>Figura 2.-</i> Curva de calibración del TROLOX en el método de DPPH	58
<i>Figura 3.-</i> Curva de calibración del TROLOX en el método de ABTS.....	58
<i>Figura 4.-</i> Extracto crudo y etanólico de <i>Curcuma longa</i> L., curcumina frente al radical libre estable de DPPH· para determinar el IC ₅₀	59
<i>Figura 5.-</i> Extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> L. frente al radical libre ABTS ⁺ para determinar el IC ₅₀	59
<i>Figura 6.-</i> Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto crudo del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L	63
<i>Figura 7.-</i> Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del extracto etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.....	66
<i>Figura 8.-</i> Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del estándar curcumina.....	68
<i>Figura 9.-</i> Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. y Curcumina sobre la línea celular tumoral DU-45	70
<i>Figura 10.-</i> Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. y Curcumina sobre la línea celular tumoral HT-29.....	71
<i>Figura 11.-</i> Actividad citotóxica de los extractos crudo, etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L. y Curcumina sobre la línea celular normal de ratón 3T3	72

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antioxidante, genotóxico y antitumoral *in vitro* del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. **Metodología:** La capacidad antioxidante fue determinada *in vitro* mediante los ensayos 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS). El efecto genotóxico en el ADN genómico humano fue evaluado mediante el método Tomasevich. El efecto antitumoral fue mediante exposición de los extractos y 5-FU en líneas celulares. **Resultados:** El extracto crudo y etanólico presentaron para el radical DPPH un IC₅₀ de 17,01 ± 0,004 µg/mL y 64,26 ± 0,002 µg/mL; mediante el ensayo de ABTS un IC₅₀ 15,12 ± 0,0025 µg/mL y 57,67 ± 0,0025 µg/mL respectivamente. El extracto crudo a partir de la concentración de 25 mg/mL hasta 200 mg/mL presentaron efecto genotóxico; el extracto etanólico no presentan efecto genotóxico a ninguna concentración (5 mg/mL hasta 200 mg/mL). El extracto crudo evidenció una IG₅₀ de 15,71±11 µg/mL para la línea celular tumoral HT-29 que es significativamente inferior a DU-145 con una IG₅₀ de 72,27±14 µg/mL; para el caso del extracto etanólico presentan un IG₅₀ óptimo 20,61 y 15,71 (µg/mL) para ambas líneas celulares DU-145 y HT-29. **Conclusiones:** Ambos extractos de *Curcuma longa* L. exhiben capacidad antioxidante, el extracto etanólico tiene muy buena capacidad antioxidante en comparación del extracto crudo. El extracto crudo de *Curcuma longa* L, presenta un efecto genotóxico dependiente de su concentración, mientras que el extracto etanólico no lo presenta. Se ha demostrado que ambos extractos presentan efecto antitumoral *in vitro* selectivo para la línea celular tumoral humana DU-145 y HT-29.

Palabras claves: Antioxidantes, genotóxico, antitumoral, *Curcuma longa* L., DPPH, ABTS, ADN genómico humano, DU-145, HT-29.

SUMMARY

Objective: to determine the antioxidant, genotoxic and antitumoral capacity in vitro of the crude and ethanolic extract from *Curcuma longa* L. rhizome.

Methodology: Antioxidant capacity was determined in vitro by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid (ABTS) assays. The genotoxic effect in human DNA was means by Tomasevich method. The antitumor effect was by exposure from extracts and 5-FU in cell lines. **Results:** The crude and ethanolic extract presented an IC₅₀ of $17.01 \pm 0.004 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $64.26 \pm 0.002 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the DPPH· radical; by the ABTS assay an IC₅₀ of $15.12 \pm 0.0025 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $57.67 \pm 0.0025 \mu\text{g} / \text{mL}$ respectively. The crude extract from the concentration of 25 mg / mL to 200 mg / mL showed a genotoxic effect; the ethanolic extract had not genotoxic effect at any concentration (5 mg / mL up to 200 mg / mL). The crude extract showed an IG₅₀ of $15.71 \pm 11 \mu\text{g} / \text{mL}$ for the HT-29 tumor cell line that is significantly lower than DU-145 tumor cell line with an IG₅₀ of $72.27 \pm 14 \mu\text{g} / \text{mL}$; from ethanolic extract, they present an optimal IG₅₀ 20.61 and 15.71 ($\mu\text{g} / \text{mL}$) for both cell lines DU-145 and HT-29. **Conclusions:** Both extracts of *Curcuma longa* L. showed antioxidant capacity; the ethanolic extract has very good antioxidant capacity compared to crude extract. The crude extract of "turmeric", had genotoxic effect that depends on its concentration, while the ethanolic extract did not present that effect. Both extracts have shown in vitro antitumor selectivity effect for the human tumor cell line DU-145 and HT-29.

Key words: Antioxidants, genotoxic, antitumoral, *Curcuma longa* L., DPPH, ABTS, genomic human DNA, DU-145, HT-29.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática.

El Cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial y en nuestro país, durante el período comprendido entre enero y diciembre de 2017 se registraron 10,650 casos de cáncer; de los cuales, 7,537 correspondieron a casos nuevos (70,8 %), los casos procedían de 47 establecimientos de salud notificantes a nivel nacional (MINSA-boletín epidemiológico del Perú, 2018). Estimaciones de GLOBOCAN (Bray y otros, 2018) sobre incidencia y mortalidad del cáncer, indican que este año habrá 18,1 millones de nuevos casos de cáncer (17,0 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma) y 9,6 millones de muertes por cáncer (9,5 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma), en ambos sexos combinados. El diagnóstico de cáncer más frecuente es el de pulmón, 11,6% y representa el 18,4 % del total de muertes por cáncer. Les sigue el cáncer de mama femenino con 11,6%, después el cáncer colon rectal con 10,2%, luego el cáncer de próstata con 7,1%, seguido por el cáncer de estómago con 8,2% y finalmente el cáncer de hígado con 8,2%. La incidencia del cáncer de mama se diagnostica con mayor frecuencia y es la causa principal de muerte, seguido del cáncer colon rectal y pulmonar.

El Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) especifica que el 75% de los nuevos casos de cáncer que se presentan en el país son prevenibles o se pueden detectar a tiempo. (70,000 casos de cáncer cada año). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que para el 2030 contraerán el cáncer 21,3 millones de personas, de los

cuales morirán 13,1 millones de personas. Esta tendencia al incremento de casos se presenta sobre todo en países subdesarrollados (66.6%) a nivel mundial (INEN, 2016).

Los datos de mortalidad sobre cáncer recolectados por el Centro Nacional de Estadística de Salud proyectaron para el 2017: 1, 688,780 nuevos casos de cáncer y 600,920 muertes por cáncer en los Estados Unidos. La tasa de incidencia de cáncer es 20% más alta en hombres que en mujeres, mientras que la tasa de mortalidad por cáncer es 40% más alta (Siegel, Miller & Jemal, 2017). La terapia del cáncer de colon en hombres y mujeres, así como el cáncer de próstata, son considerados de un alto impacto económico, tanto a nivel de la salud pública como de las familias.

Muchas investigaciones han establecido el efecto preventivo de la ingesta de frutas, verduras, especias y hierbas aromáticas por el aporte de antioxidantes, se ha relacionado con una disminución del riesgo de Enfermedades no transmisibles (ENT) como enfermedades cardiovasculares, gástricas, respiratorias, neurológicas, del sistema endocrino, cáncer e isquemia entre otras. La Sociedad Americana contra el Cáncer (American Cancer Society) ha ratificado que, para disminuir la probabilidad de cáncer, debemos obtener los antioxidantes a través de fuentes alimenticias y no por suplementos sintéticos (García & Saldaña, 2012).

De acuerdo a estas revisiones científicas, en el Perú se cuenta con fuentes naturales de antioxidantes en especies alimentarias, como *Curcuma longa* L., que debe de ser reconocida desde la investigación científica y los aportes que se demuestren en su actividad molecular sobre líneas celulares, permitirán reconocerlas con el potencial terapéutico que se deriven, disminuyendo así la problemática de acceso a medicamentos o ser parte del tratamiento en la clínica desde la mirada del alimento funcional, de esta forma es que nos proponemos realizar la siguiente investigación a partir del problema.

1.2 Formulación del problema de investigación.

¿Cuál es la capacidad antioxidante, antitumoral y genotóxico del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo”?

1.3 Justificación Teórica.

El cáncer es un grupo de enfermedades relacionadas de origen multifactorial que puede afectar a cualquier parte del cuerpo. El cáncer es el crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción en diferentes tejidos. El desarrollo del cáncer es un proceso dinámico, a largo plazo y de etapas múltiples que involucra muchos factores complejos en su inicio, promoción y progresión (Ullah y otros, 2014). Un factor predisponente que actualmente se ha encontrado relacionado con las ENT (diabetes, cáncer, aterosclerosis, artritis reumatoide, isquemias) es el estrés oxidativo crónico generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS), que se encuentran como mediadores patológicos que causan daño al ADN en seres humanos (Kriston, Georgiev, Pissis & Georgakilas, 2011).

Existe evidencia clara de que la inflamación juega un papel crítico en el proceso de carcinogénesis y que el microambiente inflamatorio es un componente esencial de todos los tumores. Las respuestas inflamatorias están involucradas en la iniciación y promoción del cáncer, la transformación maligna de las células o en la invasión y metástasis de las células cancerosas. El vínculo importante entre la inflamación y la carcinogénesis, es el factor nuclear kappa B proinflamatorio (NF- κ B). Además, los mediadores inflamatorios tales como las citoquinas proinflamatorias estimulan también la supervivencia y la proliferación de células pre malignas y activan factores de transcripción oncogénicos (Kapinova y otros, 2018).

Durante el proceso inflamatorio crónico, se producen una variedad de mediadores citotóxicos que juegan un papel crítico en el desarrollo de cáncer en humanos; los radicales libres (RL), es decir, ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) que causan daño del ADN como roturas de doble cadena (DSB) o rupturas de una sola hebra (SSB). El daño acumulado en el ADN debido a las DSB puede conducir a mutagénesis y reordenamientos cromosómicos, que contribuyen aún más en la carcinogénesis a través de la inestabilidad genómica (Anuja y otros, 2017).

Una fuente segura y económica de nuevos y efectivos principios activos son los fitoterapéuticos, derivados de plantas que desempeñan muchas actividades biológicas en humanos, con propiedades farmacológicas, especialmente como agentes antioxidantes, antiradicales libres, antiinflamatorios y anticancerígenas (Coronado, Vega y León, Gutierrez y Vásquez, 2015).

En los últimos 25 años, el 63 % de principios activos anticancerígenos, introducidas, son o han sido diseñados a partir de fuentes de origen natural (Casado, Mora, Ferrer, Fernández y Pino, 2016).

El comprobar la capacidad antioxidante y antitumoral del rizoma de *Curcuma longa* L y por su consumo frecuente ayudaría a retrasar la reacción desencadenada por los radicales libres, previniendo enfermedades crónicas no transmisibles como cardiovasculares, cáncer y el envejecimiento prematuro.

1.4 Justificación Práctica.

Como proceso de migración, el rizoma de *Curcuma longa* L. llegó a nuestro país desde la India, utilizándose principalmente como especia en la gastronomía peruana. Este rizoma se presenta como un producto natural de gran poder curativo descrito en la cultura medicinal para el tratamiento del cáncer (Calaf, Ponce-Cusi & Carrión, 2018); no obstante, hay pocos estudios científicos en nuestro país que confirmen y avalen la

actividad biológica de esta planta por lo que esta investigación pretende demostrar la actividad antioxidante, genotóxica y antitumoral de la *Curcuma longa* L sobre líneas celulares, dando validez al uso tradicional.

1.5 Objetivos de la Investigación.

1.5.1 *Objetivo General.*

Evaluar la capacidad antioxidante, genotóxica y antitumoral del extracto crudo y etanólico del *Curcuma longa* L. (palillo).

1.5.2 *Objetivos específicos.*

- 1.- Determinar la capacidad antioxidante y fenoles totales del extracto crudo y etanólico del rizoma del *Curcuma longa* L. (palillo) in vitro.
- 2.- Determinar la capacidad genotóxica in vitro del crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo) y curcumina.
- 3.- Determinar la capacidad antitumoral in vitro del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo) y curcumina en líneas celulares de cáncer.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación.

Los filósofos de las épocas antiguas se preocuparon siempre de aquello que competía al hombre, tanto en su aspecto físico como en el mental. De esta manera llegaron a precisar que la situación de salud del hombre era un aspecto muy importante en su vida. En esta época se ha retomado la preocupación del “buen vivir”, retornando también a la naturaleza.

En el trabajo se aporta al mayor conocimiento de los efectos positivos y negativos del rizoma de *Curcuma longa* L. en la salud. Las plantas han sido beneficiosas en la atención de la salud humana desde épocas antiguas.

Las plantas fueron las primeras medicinas de la humanidad. Desde los tiempos antiguos hasta los modernos, los medicamentos tradicionales a base de plantas han jugado un papel importante en la atención de la salud. A pesar de los grandes avances de la medicina científica moderna, la medicina tradicional sigue siendo la principal forma de métodos de curación disponibles para la mayoría de las personas en los países en desarrollo. De hecho, muchas de las drogas populares de hoy tienen su origen en las medicinas tradicionales. Sobre la base de los datos de la encuesta mundial, actualmente se usan como fármacos unos 119 compuestos derivados de plantas de estructura conocida. Menos de una docena de estos se producen comercialmente por síntesis; el resto se extrae directamente de las plantas. Estas 119 drogas naturales se obtienen de solo 90 especies de plantas. Dado que hay al menos

250,000 especies de plantas superiores en la tierra, se encontrarán muchos más fármacos útiles en el reino vegetal si los proyectos de investigación se llevan a cabo de una manera lógica y sistemática (Farnaworth, Akerete, Bengel, Suejanto & Guo1990).

Jiménez (1994), estima que la investigación debe considerar a la naturaleza, la sociedad y el hombre; empleando métodos para alcanzar el conocimiento, los cuales deben considerarse válidos para alcanzar resultados confiables, es así que el método científico, es para el estudio de las ciencias naturales el fundamento desde la observación, la experimentación y la elaboración de hipótesis; correspondiendo a investigador actuar con ética, en el respeto a la cultura de los actores sociales desde oriente a occidente, y de norte a sur, construyendo continuamente ciencia en la búsqueda de la verdad como ejercicio del pensamiento humano.

En esta investigación pretende indagar la generación de nuevas fuentes terapéuticas a partir del cultivo del rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo), lo que permitirá la sustentabilidad de las tierras de cultivo y el cuidado del medio ambiente.

2.2 Antecedentes de investigación.

Zamora (2007) señala que durante el estudio SU.VI.MAX, los individuos con antígeno prostático específico dentro de valores normales que recibieron suplementación con un complejo antioxidante reducen el riesgo de cáncer de próstata; y los pacientes con antígeno prostático específico elevado al recibir suplementación de antioxidantes tuvieron menor tendencia a desarrollar cáncer de próstata.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), como óxido nítrico, aniones superóxido e hidroxilo son producidos por reacciones bioquímicas celulares normales en la progresión de muchas enfermedades inflamatorias. Las ROS actúan como moléculas de señalización y mediadores de la inflamación. Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI)

presentes en las membranas celulares, se constituyen en los principales objetivos de los RL, su interacción da como resultado peroxidación lipídica (LPO). Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen para formar compuestos de carbonilo tales como malondialdehído (MDA). En un ensayo aleatorio, doble ciego, controlado con placebo en pacientes de osteoartritis evaluaron el efecto del extracto de *Curcuma longa* L. en interleuquina (IL-1b) y biomarcadores del estrés oxidativo como ROS y MDA, encontrando una reducción significativa en los niveles de estos biomarcadores en comparación con los valores iniciales luego de 2 meses de tratamiento en pacientes con osteoartritis (Srivastava, Saksena, Khattri, Kumar & Dagur, 2016)

Mazidi, Karimi, Meydani, Ghayour-Mobarhan & Ferns, (2016) expone que la *Curcuma longa* es una planta que contiene compuestos fitoquímicos, donde el polifenol curcumina posee propiedades beneficiosas como antiinflamatoria, antioxidante, antineoplásico, pro y antiapoptótico, antiangiogénicos, citotóxicos, inmuno modulador y efecto antimicrobiano, a través de la modulación de diversos metabolitos como los receptores nucleares PPARs- γ (Receptores Activados por proliferadores peroxisomales), y NF-KB.

Öner-Iyidog y otros, (2014) evalúa los efectos de suplementación con curcumina en la acumulación de lípidos hepáticos y el estado antioxidante en ratas alimentadas con dietas altas en grasa (HFD). El estrés oxidativo desempeña un papel importante en el desarrollo y progresión de hígado graso no alcohólico (NAFLD). Se sugiere que la curcumina ejerce un efecto de eliminación de radicales libres o induce enzimas de los sistemas antioxidantes. Asimismo, participa en las reacciones celulares de Fenton y reduce la formación de ROS por acción quelante de hierro (Fe) o cobre (Cu). En este estudio al medirse los niveles de biomarcadores del estrés oxidativo hepático, MDA) y dienos conjugados (DC) se incrementaron en el grupo HFD comparado con los controles. El tratamiento con curcumina fue efectivo reduciendo los altos niveles de MDA, pero no afectó los niveles de DC.

El polifenol curcumina, obtenido a partir de la *Curcuma longa* L. modula las alteraciones epigenéticas típicamente asociadas con cáncer y trastornos metabólicos por su capacidad de interferencia con enzimas implicadas en la metilación del ADN, la modificación de histonas y la expresión de micro-ARN, modulando así la estructura de la cromatina (Sahebkar, 2012).

Carvalho (2014), señala una relación entre curcumina y la disminución de la viabilidad de las células tumorales de mama (MDA-MB-231) cultivadas indica que sus resultados demuestran que la curcumina fue capaz de afectar la viabilidad de las células del linaje de cáncer de mama MDA-MB-231.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) causan mutaciones que conducen al cáncer y apoptosis. La curcumina, polifenol de *Curcuma longa* L. neutraliza los ROS induciendo las enzimas glutatión-S-transferasa (GST) y Quinina reductasa. Asimismo, la curcumina induce otra enzima que elimina los ROS, hemeoxigenasa que desencadena la regulación del factor nuclear (Qadir, Naqvi, & Muhammad, 2016).

2.3 Bases Teóricas.

2.3.1 Descripción Botánica de *Curcuma longa* L.

Curcuma longa L. “palillo” es una planta milenaria de origen de la India Oriental, continente asiático, pertenece a la familia Zingiberaceae y al género Zingiberaceae (Anexo 1). En el Perú se cultiva en grandes cantidades en la región sur–oriente, selva alta y baja; en condición de planta silvestre, se encuentra distribuida en casi toda la selva peruana. La mayor concentración de cultivos se encuentra en los departamentos de Junín, Cusco, Arequipa, Huánuco y Ucayali (Yarinacocha); existen algunas nominaciones adicionales como azafrán, curry (D´Arrigo, Fernández, Olarte & Ramberg, 2018).

La *Curcuma longa* L. es una hierba erecta perenne, de 60 a 90 cm. Tallo grueso, hojas son muy grandes con peciolo largo envolvente, opuestas de hasta 1,2 m o más de largo, incluido el pecíolo, que es casi tan largo como la cuchilla, oblongo lanceolado, afinándose hacia la base (Botero, 2011). Las flores amarillas de 10 a 15 cm de largo y se agrupan en espigas basales con brácteas violáceas que aparecen desde el final de la primavera. No existe formación de semillas, la planta se reproduce vegetativamente por esquejes a partir del rizoma. El rizoma es de color amarillo amarillento con un interior naranja opaco que se ve amarillo brillante cuando está en polvo. El rizoma mide 2,5-7,0 cm de longitud y 2,5 cm de diámetro con pequeñas ramificaciones de tubérculos (Saiz de Cos, 2014).

2.3.2 Composición química de *Curcuma longa* L.

La *Curcuma longa* L. contiene carbohidratos (69,4%), grasa (5,1%), fibra (2,6%), minerales (3,5%), proteína (6,3%) y humedad (13,2%). Asimismo 100 g de Curcuma contiene 50 mg ácido ascórbico, 0,2 g calcio, 47,5 g de hierro, 4,8 mg de niacina, 260 mg de fósforo, 200 mg de potasio, 0,19 mg riboflavina, 30 mg sodio, 0,09 mg tiamina (Sirisdithi, Kosai, Jiraungkoorskul & Jiraungkoorskul, 2016). El rizoma contiene principalmente el polifenol natural curcumina (diferuloilmetano) (3-4%), responsable del color amarillo; comprende curcumina I (94%), curcumina II (6%) y curcumina III (0,3%); dicetona fenólica, además de un aceite esencial en el parénquima cortical, rico en sesquiterpenos (turmerona, atlantona y curcumenol), monoterpenos (borneol, alcanfor, terpineno, entre otros), así como hidrocarburos terpénicos (felandreno, sabineno, cineol y turmerol) (Clapé y Alfonso, 2011). La curcumina es el polifenol primordial presente en la *Curcuma longa* L. (Alvis, Arazola y Martínez, 2012).

Los polifenoles son metabolitos secundarios que se encuentran naturalmente en las plantas y se caracterizan por presentar en su estructura uno o más anillos aromáticos unidos a uno o más grupos

hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) responsables de la capacidad antioxidante al atrapar y/o estabilizar radicales libres y quelar iones metálicos que pueden actuar como pro-oxidantes (Peñaloza y Rojano, 2014). Los polifenoles son fitoquímicos, compuestos bioactivos no nutrientes presentes en la dieta basada en plantas con propiedades anticancerígenas y antimutagénicas, por lo que pueden desempeñar un papel importante en la disminución de los diversos tipos de neoplasia al alterar numerosas vías de señalización celular implicadas en la carcinogénesis, como el ciclo celular, la apoptosis, o angiogénesis (Kapinovaet y otros, 2018). La curcumina es un polifenol lipofílico muy poco soluble en agua y estable a pH ácido. Al ser un polifenol dietario tiene características potenciales en la protección de enfermedades metabólicas (Mazidi, Karimi, Meydani, Ghayour-Mobarhan & Ferns, 2016). La curcumina es una molécula anfipática (molécula con grupos hidrófilos e hidrófobos, lo que la capacita para ser parcialmente soluble en agua y en disolventes orgánicos) (Gonzáles y otros, 2015).

2.3.3 Radicales libres.

El cuerpo produce constantemente radicales libres debido al uso regular de oxígeno. Los radicales libres se definen como especies químicas, con electrones desapareados, cargadas o no, en orbitales atómicos o moleculares que generan gran inestabilidad, con subsistencia independiente; es muy reactivo al tener un tiempo de vida media corta, por esta razón es que accionan cerca al sitio de su formación, con tendencia a sustraer un electrón de especies químicas estables, para lograr su estabilidad, desestabilizando la configuración electrónica de las moléculas con las que ha reaccionado, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas, desencadenando reacciones en cadena. Está representado por el punto situado a la derecha del símbolo del RL (Yadav, Kumbhar, Jan, Roy & Satsangi, 2018).

El término "ROS", especies reactivas de oxígeno se define como familias de radicales libres centrados en el oxígeno o relacionados con

el oxígeno, por ejemplo, el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), radicales hidroperoxilo ($H_2O^{\cdot-}$) (Ríos-Arrabal y otros, 2013). La reactividad de los compuestos difiere drásticamente: las vidas medias oscilan entre nanosegundos (p. Ej., radical hidroxilo) y horas (p. Ej., peróxido de hidrógeno *in vitro*), dependiendo de la estabilidad y de la descomposición enzimática de la molécula en el compartimiento celular fisiológico. Por lo general, las ROS se inactivan mediante (i) mecanismos enzimáticos, por ejemplo, enzimas antioxidantes como superóxido dismutasas (SOD), glutatión peroxidasas (GPx) y catalasa (CAT), o (ii) por captadores de radicales no enzimáticos de bajo peso molecular como la vitamina E o el glutatión. En condiciones fisiológicas, se mantiene un balance entre la producción celular de ROS y la eliminación por mecanismos de defensa celular (homeostasis celular) (Roberts, Kehrer & Klotz, 2015)

Las ROS son componentes químicamente reactivos que contiene oxígeno como un subproducto natural del ciclo del metabolismo aeróbico. Al igual que las ROS, las RNS se derivan de las interacciones de las especies reactivas libres generadas biológicamente para formar especies más persistentes que producen múltiples efectos biológicos (Forouzandeh y otros, 2017). Las RNS pueden o no ser RL; encontramos los radicales óxidos nítricos (NO^{\cdot}) y dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y los no radicales peroxinitrito ($ONOO^-$), entre otros. El NO^{\cdot} es una molécula de señalización, participa en muchos procesos biológicos como el control de la HTA al relajar los vasos y músculo liso (Chirino, Orozco-Ibarra, & Pedraza-Chaverrí, 2006).

Las ROS se desarrollan en el ser humano a partir de fuentes endógenas y exógenas. La principal fuente endógena es la respiración mitocondrial, por ejemplo, el proceso de fosforilación oxidativa, metabolismo mediado por citocromo P450, a nivel de los complejos I y III para la obtención de energía (se estima que el 1-2% de los electrones transportados generan radical superóxido) (Macedo-Márquez, 2012). Una segunda fuente endógena es utilizada por el sistema de defensa, por ejemplo, se ha demostrado que los ROS desencadenan la

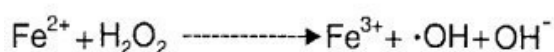
proliferación de células T a través de la activación de NF- κ B, a nivel de los macrófagos y neutrófilos generan ROS para eliminar los microorganismos por fagocitosis. Otras fuentes internas involucran reacciones con hierro y otros metales de transición; a nivel de los peroxisomas, ejercicio, isquemia, inflamación (Marotte & Zeni, 2013).

El peróxido de hidrogeno (H_2O_2) es principalmente producto de la dismutación del radical superóxido que es producido en la mayoría de las reacciones catalizadas por las NADPH oxidasas, por la fuga de electrones provenientes de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, biotransformación de xenobióticos, flavoproteínas; por la β -oxidación de ácidos grasos en los perixosomas (Carrillo y otros, 2016).

Di Meo, Reed, Venditti & Victor, (2016) señala como fuentes celulares productoras de RL: 1° Mitocondrias; 2° perixosomas, organelos derivados del retículo endoplásmico presentes en casi todas las células eucariotas que llevan a cabo una gama de actividades metabólicas en respuesta a cambios ambientales y demanda celular que incluyen la β -oxidación de algunos ácidos grasos, metabolismo oxidativo de aminoácidos y glioxilato; procesos que durante su actividad producen ROS. Asimismo, reporta estudios en hígado de ratas, donde el peróxido de hidrógeno formado alrededor del 35% deriva de oxidasas periaxiales, señala que alrededor del 20-60% del H_2O_2 generado en el interior de los peroxisomas son difundidos al entorno al atravesar fácilmente la membrana peroxisomal. 3° Retículo endoplásmico liso que presenta una cadena de transporte de electrones constituido por dos sistemas dedicados al metabolismo de xenobiótico, metabolismo e introducción de dobles enlaces en ácidos grasos. 4° La membrana celular al estar expuesto a un ambiente oxidante podría generar células disfuncionales al aumentar la permeabilidad de la membrana causado por la oxidación de los lípidos o alteración de proteínas estructurales, resultando en una disminución de la gradiente de iones transmembrana. Los RL, se pueden producir durante la conversión del ácido araquidónico (que forma parte de la estructura de los fosfolípidos de membrana) al liberarse por activación de fosfolipasa C y A2 o ambas en productos como

prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos por enzimas asociadas a la membrana como la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa. Asimismo, por la activación de la enzima NADPH oxidasa. 5° Los lisosomas, organelos celulares, presentes en todas las células animales que contienen enzimas hidrolíticas para la digestión intracelular controlada de macromoléculas en procesos como fagocitosis, como parte de la defensa inmune primaria. Las células fagocíticas tales como neutrófilos, monocitos o macrófagos al defendernos producen grandes cantidades de superóxido (O_2^-) que se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo ($OH\cdot$). 6° la xantina oxidasa (enzima responsable de la conversión de hipoxantina en ácido úrico) en el citoplasma, genera radicales libres superóxidos (O_2^-), asimismo, la auto oxidación de catecolaminas y flavinas pueden producir la reducción incompleta del oxígeno y generar superóxido (O_2^-).

La reacción de Fenton es una de las reacciones más conocidas en donde se produce el radical hidroxilo; el peróxido de hidrógeno reacciona con iones de metales de transición (hierro, cobre) dando lugar a la formación del radical hidroxilo ($OH\cdot$) (Delgado, Betanzos y Sumaya, 2010).



Los ROS exógenos puede producirse por mecanismos ya sea directo o indirecto para enfrentar drogas, hormonas y otros xenobióticos químicos, incluyen varias especies como el anión superóxido (O_2^-), hidroxilo ($OH\cdot$) y radicales peróxido ($ROO\cdot$); y ciertos no radicales como oxígeno singlete (1O_2) e hidrógeno peróxido (H_2O_2) que pueden ser fácilmente convertidos en radicales. Entre las fuentes exógenas que incrementan el porcentaje de ROS son el humo del cigarrillo, exposición a contaminantes del medio ambiente como UV, radiaciones ionizantes, ozono, ciertos medicamentos, xenobióticos (pesticidas, herbicidas, fungicidas), anestésicos y disolventes industriales. Los factores fisiológicos también son responsables de la formación de radicales libres, tenemos el estado

mental como estrés, emociones negativas como miedo, etc. y condiciones de enfermedad (Tegeli, Karpe and Katve, 2014).

Los ROS ocasionan sobre las tres principales macromoléculas, deterioro celular: (i) Lípidos, las membranas celulares tienen como constituyente esencial a los AGPI, vulnerables a la oxidación por ROS debido a la alta concentración de ácidos grasos insaturados en sus componentes lipídicos. Al reaccionar los ROS con lípidos de la membrana causa la peroxidación de lípidos, ocasionando enlaces cruzados de proteínas de membrana que alteran la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. (ii) Las proteínas pueden sufrir daños directos e indirectos después de la interacción con ROS como resultado de la peroxidación; cambios en su estructura terciaria, degradación proteolítica, enlaces cruzados proteína-proteína y fragmentación. Los productos de oxidación de proteínas son usualmente grupos carbonilos tales como aldehídos y cetonas. (iii) El Ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula estable, al interactuar con los ROS ocasiona la modificación de las bases en el ADN, roturas en una cadena o doble cadena del ADN, con eliminación de purinas, daño al azúcar desoxirribosa, entrecruzamiento entre ADN y proteínas, daño al sistema de reparación del ADN; lo que conduce a la formación de daño oxidativo con lesión mutagénica en el ADN celular, seguido por la ruptura de la cadena de ADN. La consecuencia del daño al ADN es la modificación de genes que resulta en la muerte celular, mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento (Kunwar and Priyadarsini, 2011).

2.3.4 Estrés oxidativo.

En un estado fisiológico normal, se presenta un equilibrio celular entre la producción de ROS y la eliminación, ya que las células eucariotas tienen varios mecanismos de defensa antioxidante, incluido las enzimas y los antioxidantes. Es indispensable el balance entre la producción endógena de ROS para la regulación de las diferentes vías metabólicas. Sin embargo, cuando la sobreproducción celular de ROS supera la capacidad antioxidante intrínseca, se rompe el equilibrio, causado por el

desarrollo incontrolado de RL o por la falta de antioxidantes. Este estado se denomina estrés oxidativo, y a continuación, se produce el daño a las biomoléculas de las células y tejidos normales. El estrés oxidativo generalmente resulta de una producción excesiva de ROS, por disfunción mitocondrial, sistema antioxidante deteriorado o una combinación de estos factores. El desequilibrio celular pro-oxidativo / antioxidante entre la producción de ROS y la capacidad de los mecanismos de defensa de los sistemas biológicos para eliminar las perturbaciones del estrés celular conduce al círculo vicioso, ya que el estrés oxidativo agrava recíprocamente la producción de ROS. Las ROS pueden generarse a tasas elevadas en el envejecimiento normal, así como en condiciones fisiopatológicas agudas o crónicas (Nita & Grzybowski, 2016).

El estrés oxidativo “SO” resulta de la proliferación descontrolada de los radicales libres y una disminución en la capacidad del sistema biológico humano para desintoxicar, conduciendo a daños potenciales que alteran la salud del ser humano como enfermedades cardíacas, diabetes, degeneración macular y cáncer (Rodríguez, Peña, Gómez, Lozano & Hernández, 2015).

Se considera que la generación de estrés oxidativo en la célula es un mecanismo involucrado en el proceso de carcinogénesis: desbalance entre los ROS y la capacidad antioxidante en una célula puede conducir al daño oxidativo de las macromoléculas celulares (ADN, proteínas, lípidos) que pueden dar como resultado (i) la formación de lesiones mutagénicas de ADN y (ii) la modulación de las vías de señalización intracelular que afectan a los parámetros centrales de la célula, por ejemplo, el estado redox, la apoptosis, los mecanismos de reparación del ADN y la proliferación celular (Roberts, Kehrer and Klotz, 2015).

Los ROS y RNS se generan a partir de fuentes endógenas o exógenas. Los radicales libres endógenos se generan a partir de la activación de las células inmunitarias, la inflamación, el estrés mental, el ejercicio excesivo, la isquemia, la infección, el cáncer, el envejecimiento. Los ROS / RNS exógenos son el resultado de la

contaminación del aire y el agua, el humo del cigarrillo, el alcohol, los metales pesados o metales de transición (Cd, Hg, Pb, Fe, As), ciertos medicamentos (ciclosporina, tacrolimus, gentamicina, bleomicina), disolventes industriales, cocción (ahumados de carne, aceite usado, grasa), radiación. Después de la penetración en el cuerpo por diferentes vías, estos compuestos exógenos se descomponen o se metabolizan en radicales libres, ocasionando una sobrecarga de radicales libres que no se pueden destruir gradualmente, su acumulación en el cuerpo genera una situación llamada estrés oxidativo. Este proceso juega un papel importante en el desarrollo del envejecimiento, enfermedades crónicas y enfermedad degenerativas como cáncer, trastornos autoinmunes, envejecimiento, cataratas, artritis reumatoide, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, la aterosclerosis, Alzheimer, Diabetes Mellitus, etc. (Pham-Huy L., He and Pham-Huy Ch., 2008).

El stress oxidativo causa daño a nivel del ADN, ARN, proteínas y lípidos; dando lugar a la inestabilidad cromosómica, mutación a nivel de genes y alteraciones en la expresión genética. Todo en conjunto desarrolla cáncer en humanos. Estudios sobre mutaciones sugieren que el estrés oxidativo crónico presente en la inflamación crónica, se asocia con carcinogénesis, Por ejemplo, la colitis ulcerativa se ha relacionado durante mucho tiempo con la alta incidencia de cáncer colon rectal; la gastritis crónica como la infección con *H. pylori*, se ha asociado con una alta incidencia de cáncer gástrico (Klauning, Kamendulis and Hocevar, 2010).

El término "enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo" se entiende como anomalías funcionales o patológicas claramente definidas que involucran la participación de radicales libres. Este desequilibrio también puede verse afectado por la interacción con metales, incluido el hierro, cobre, cromo y cobalto (Ríos-Arrabal y otros, 2013).

2.3.5 Radicales Libres en Carcinogénesis.

Actualmente, el cáncer es considerado como un desorden de células que se dividen anormalmente, lo que conduce a la formación de agregados que al crecer dañan a tejidos vecinos alterando su fisiología. La proliferación puede estar localizada (tumor) o propagarse a otros sitios, por vía linfática y por vía sanguínea (metástasis) (ACS, 2018; Sánchez C., 2013). La formación de células cancerosas (carcinogénesis) es un proceso de varios pasos que implica iniciación, promoción y progresión, que en última instancia conduce a una expansión de células mutadas. Diversos agentes químicos y físicos son capaces de modular este proceso complejo que resulta en un tumor clínico a partir de una sola célula. Se sabe que el estrés oxidativo (SO) influye en las actividades de los mediadores inflamatorios y otros procesos celulares implicados en la iniciación, promoción y progresión de neoplasmas humanos, incluido el cáncer de próstata y colon (Nakai & Nonomura, 2013)

El estrés oxidativo (SO) se considera uno de los mecanismos que desencadenan la cadena de reacciones involucradas en el desarrollo y progresión de la hiperplasia prostática. El SO es una condición en el entorno celular cuando hay un desbalance entre la generación de ROS y la función de los sistemas biológicos para reparar o neutralizar el daño oxidativo. Una dieta alta en grasas (HFD) ha sido identificado como un factor de riesgo para cáncer de próstata porque HFD induce estrés oxidativo e inflamación en la próstata, incrementando los niveles de citoquinas proinflamatorias (Udensi & Tchounwou, 2016).

Las ROS, las RNS desempeñan un doble papel, ya que pueden ser dañinas o beneficiosas para los sistemas vivos. Un exceso de estas sustancias altamente reactivas (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) pueden causar daño severo a biomoléculas celulares como ADN, lípidos y proteínas con un impacto potencial en la célula y el

organismo completo. A nivel celular, el estrés oxidativo puede causar la inhibición o inducción de la muerte celular apoptótica o una alteración de las vías de transducción de señales intracelulares, dependiendo del grado del "desequilibrio" de ROS. En las células no transformadas, las concentraciones de ROS a bajo nivel son necesarias para la transducción de señales, mientras que las concentraciones altas pueden causar efectos tóxicos. Por el contrario, las células cancerosas necesitan concentraciones relativamente altas de ROS para proliferar (Di Meo, Reed, Venditti & Victor, 2016).

Los ROS puede considerarse como un desencadenante de mutaciones genéticas, así como alteraciones cromosómicas, que producen la muerte celular selectiva y, finalmente, un aumento compensatorio en la proliferación celular. Este estímulo puede resultar en la formación de nuevas células pre neoplásicas contribuyendo al desarrollo del cáncer a través de varios pasos de la carcinogénesis. El estrés oxidativo se ha relacionado con hiperplasia prostática benigna (BPH) y varios tipos de cáncer (Forouzandeh y otros, 2017).

El daño oxidativo al ADN es un factor causante del cáncer humano inducido por IR, luz ultravioleta, metales de transición y iones metálicos. Estudios recientes han demostrado la fuerte correlación entre un estrés oxidativo persistente o crónico y la carcinogénesis humana, carcinogénesis esofágica, cáncer colon rectal, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de piel no melanoma y cáncer relacionado con la depresión (Roberts, Kehrer and Klotz, 2015).

Investigaciones demuestran la asociación entre el estrés oxidativo con la carcinogénesis, las exposiciones a los carcinogénicos involucran daño oxidativo. Los carcinogénicos químicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, el benceno, etc., son inactivos y requieren ser activados metabólicamente. El principal sistema enzimático responsable de la activación de sustancias químicas para la formación de sustancias tóxicas / carcinógenas son las oxidasas, localizadas en el retículo

endoplásmico del hígado de mamíferos y otros tejidos (García, Saldaña, A. y Saldaña, L., 2012).

La inflamación juega un papel crítico en la patogénesis de varias enfermedades que van desde la carcinogénesis a los trastornos autoinmunes. La curcumina ejerce una potente actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de enzimas, como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la lipoxigenasa (LOX), y sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) cuya expresión está regulada por varias citocinas, como las interleucinas y los factores de necrosis tumoral (TNF- α). Las enzimas COX-2, LOX e iNOS son importantes mediadores de procesos inflamatorios y la inadecuada regulación de COX-2 y / o iNOS se ha asociado con la fisiopatología de ciertos tipos de cáncer humano, así como con trastornos inflamatorios. La curcumina con su potente propiedad antiinflamatoria ejerce efectos quimiopreventivos sobre la carcinogénesis (Kyoung y otros, 2019).

Las ROS de fuentes endógenas y exógenas deben ser neutralizadas por los antioxidantes (enzimas antioxidantes y depuradores de radicales libres) para no causar daño oxidativo al ADN y otras biomoléculas importantes en la inestabilidad genética que afectan el ciclo celular, la reparación celular y la muerte celular (apoptosis, senescencia o autofagia). Los radicales libres también afectan los procesos de inflamación, diferenciación y proliferación celular. Finalmente, con respecto a la carcinogénesis, estos radicales han sido implicados en la progresión tumoral, la angiogénesis, la respuesta inmune y el potencial invasivo metastásico de las células tumorales (Ríos-Arrabal y otros, 2013).

Durand y Mach, (2013), mencionan que los usos de antioxidantes podrían impedir el probable proceso de la peroxidación lipídica, actuando como agentes quimiopreventivos, que se cree produce el cáncer. Asimismo, indica que los antioxidantes, podrían inducir la muerte de célula cancerosa y coadyuvar a la acción de la quimioterapia.

2.3.6 Antioxidantes.

Los antioxidantes son compuestos químicos beneficiosos para la salud que reaccionan con un exceso de ROS y RNS en condiciones de “estrés oxidativo”, que pueden prevenir, neutralizar o reparar de una manera directa o indirecta el daño celular causado por los radicales libres, tales como oxidación a lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (López, Fernando, Lazarova, Bañuelos & Sánchez, 2012).

Los antioxidantes inhiben el proceso de oxidación, se presentan en baja concentración en comparación con las de un sustrato oxidable, y convierten a los radicales libres en especies menos reactivas. Los antioxidantes son capaces de inactivar a los radicales con dos mecanismos principales SET (transferencia de electrones individuales) y HAT (transferencia de átomos de hidrógeno) (Sahari & Berenji, 2015).

Los antioxidantes pueden donar sus propios electrones a ROS y neutralizar los efectos adversos que causan daño al ADN, proteínas y lípidos, al terminar las reacciones en cadena. El cuerpo ha desarrollado varios sistemas antioxidantes para tratar la sobreproducción de pro-oxidantes, actúan como eliminadores de ROS, con el objetivo de mantener el equilibrio. Estudios sugieren que la curcumina actúa como un antioxidante en las células normales mientras tiene un comportamiento favorable pro-oxidante en células tumorales. La curcumina se convierte en un potente agente antitumoral (Kunwar and Priyadarsini, 2011).

La actividad antioxidante no solo es dependiente de sus características estructurales, sino también de muchos otros factores, como concentración, temperatura, tipo de sustrato, estado físico del sistema, así como micro componentes que actúan como pro-oxidantes o sinérgicos. Determinar la capacidad antioxidante de los componentes de los alimentos, los términos de actividad antioxidante y capacidad

antioxidante a menudo se usan indistintamente, pero se debe reconocer que tienen diferentes significados. La actividad se refiere a la constante de velocidad de una reacción entre un antioxidante específico y un oxidante específico. La capacidad es una medida de la cantidad (como una mol) de un radical libre determinado secuestrado por una muestra (Gulcin, 2016).

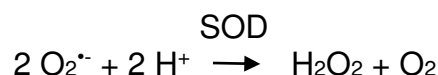
Los antioxidantes naturales se sintetizan en el cuerpo humano mediante un proceso metabólico o se complementan con otras fuentes naturales; su actividad depende de sus propiedades físicas, químicas y su mecanismo de acción. Esto se puede dividir en dos categorías, antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos

2.3.6.1 Antioxidantes enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos ejercen la remoción de ROS y productos de oxidación al catalizar o acelerar reacciones químicas (Bhattacharya, 2015). Los antioxidantes enzimáticos son sintetizados únicamente en el cuerpo humano y se pueden subdividir en antioxidantes primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios incluyen principalmente la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión peroxidasa (GPx) como se describe a continuación.

Superóxido dismutasa (SOD) E.C. 1.15.1.1

La superóxido dismutasa (SOD) es la enzima antioxidante clave en la desintoxicación de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La superóxido dismutasa (SOD) neutraliza al radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) para evitar la reducción secuencial y dar lugar a otros radicales libres más reactivos y peligrosos como es el hidroxilo (OH^{\cdot}). El radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es transformado en un radical secundario (H_2O_2). La SOD es una metaloproteína, se clasifica en tres tipos según el metal encontrado en el sitio activo: Mn-SOD, Fe-SOD y CuZn-SOD

(Villa, Moreno y Cevallos, 2008). Esta enzima se encuentra en 4 isoformas: (1) En el citosol intracelular está presente la isoforma de cobre y zinc (Cu / Zn-SOD, SOD1), (2) la isoforma de manganeso (Mn-SOD, SOD2) está presente en matriz mitocondrial (3) la isoforma Cu / Zn SOD (EC-SOD) extracelular y la isoforma SodFe presente en bacterias, algas y vegetales. (Roberts, Klots & Kehrer, 2015).



Catalasa (CAT). Peróxido de Hidrógeno Oxido-reductasa
E.C. 1.11.1.6

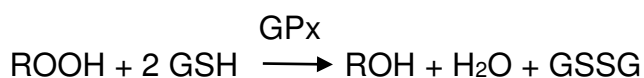
La enzima catalasa (CAT) se encuentra en la sangre, es una hemoproteína que se concentra principalmente a nivel celular en los peroxisomas y en las mitocondria, en los eritrocitos en el citosol. La catalasa se distribuye ampliamente en el cuerpo humano, en elevada cantidad en hígado y riñón y baja en tejido conectivo y epitelios. Presenta dos funciones fundamentales, metabolizar el H₂O₂ en agua y oxígeno, y una variedad de sustratos como etanol, metanol, fenol y nitritos por la actividad peroxidasa (Ahumada & Bardales, 2011).



Glutación peroxidasa (GPX) E.C. 1.11.1.9

El glutación peroxidasa (GPx) es un grupo de enzimas dependientes del selenio. Los principales órganos implicados en la síntesis y degradación de este grupo de enzimas son el hígado y el riñón. Se presentan como: (1) “GPx (celular y plasmática)”, cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno mediante la

presencia de glutatión reducido (GSH); como resultado, se produce glutatión oxidado (GSSG) y nuevamente se recicla a su forma reducida mediante glutatión reductasa (GR) y (NADPH) (Ahumada & Bardales, 2011).

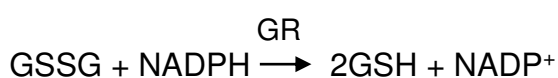


(2) “*GSH-Px extracelular*”, con funciones similares a la “*GSH-Px (celular y plasmática)*”; (3) “*GSH-Px fosfolípido hidroperóxido*”, su función es impedir la lipoperoxidación de ácidos grasos en las membranas celulares, previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad; (4) “*GSH-PX gastrointestinal*”, disminuye los hidroperóxidos de colesterol y el efecto tóxico de la ingesta de hidroperóxidos lipídicos es contra restada. En el tracto gastrointestinal la *GSH-PX* es la que se encuentra en forma mayoritaria (Corrales & Muñoz, 2012).

El antioxidante enzimático secundario incluye glutatión reductasa (GR) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). La G6PDH genera NADPH. Se requiere GR para reciclar el glutatión reducido (GSH) usando la enzima secundaria GR y NADPH.

Glutatión-disulfuro reductasa GR EC 1.8.1.7

Su función es mantener el glutatión en su forma reducida (GSH) y mantener equivalentes reductores de NADPH. La representación de la reacción es la siguiente: (Janiak, Suska, Dudzin and Skotnicka, 2010).



2.3.6.2 Antioxidante no enzimático. El sistema de antioxidantes no enzimático se obtiene a través de la dieta y está constituido por diferentes compuestos denominados “limpiadores” de radicales libres que participan retrasando la producción y acción de los radicales libres, incluyen minerales (Se, Mn, Cu y Zn), vitaminas (A, C y E), y otros compuestos (glutación, flavonoides, bilirrubina, ácido úrico, ácido lipoico, coenzima Q, melatonina etc.). La Vitamina C es un donante de electrones, y esta capacidad está presente en todas sus funciones conocidas. Neutraliza el oxígeno singulete, captura radicales hidroxilo. La Vitamina E neutraliza también la producción de hidroperóxido de ácidos grasos poliinsaturados. Igualmente, los carotenoides por su estructura molecular (grupos funcionales y dobles enlaces conjugados) neutralizan a los ROS. (Mayor-Oxilia, 2010).

Roehrs y otros (2011) realizan un estudio de antioxidantes en pacientes en hemodiálisis, indica la importancia de antioxidantes exógenos, como carotenoides (licopeno, luteína, zeaxantina, α y β -caroteno, β -criptoxantina), vitamina E (α y γ -tocoferol); y encuentra que la disminución antioxidante exógenos (licopeno) y endógenos (actividad GPx) asociados con el perfil lipídico podría influir directamente en la morbilidad y la mortalidad en pacientes.

Los antioxidantes exógenos están formados por diferentes metabolitos secundarios como los polifenoles y los fitoestrógenos. Los compuestos polifenólicos refieren capacidad de prevenir el daño por ROS, a través de la eliminación de RL o prevenir la generación de estas especies reactivas. Entre los fenoles se encuentran los flavonoides y los taninos. Los polifenoles se dividen en varias clases como las catequinas, flavonoles, flavonas, antocianinas, proantocianidinas y ácidos fenólicos. Dentro de los flavonoides comprenden las

antocianinas, catequinas, citroflavonoides, isoflavonoides y las protoantocianidinas (Coronado, Vega y León, Gutiérrez, y Vázquez, 2015).

2.3.7 Determinación de capacidad antioxidante *in vitro*.

Los métodos para la determinación de la capacidad antioxidante de los componentes de plantas para contrarrestar a los radicales libres se da mediante dos mecanismos principales, ensayos basados en la reacción SET (transferencia de electrones individuales) y ensayos basados en la reacción HAT (transferencia de átomos de hidrógeno). Los mecanismos SET y HAT casi siempre ocurren juntos en todas las muestras, con un equilibrio determinado por la estructura antioxidante y el pH (Gulcin, 2012).

2.3.7.1 Ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). El radical DPPH \cdot es uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánicos estables, que muestra una absorbancia máxima a 517 nm y tiene un color púrpura oscuro, se encuentra disponible comercialmente y no tiene que generarse antes del ensayo como ABTS. El reactivo DPPH es conocido por su alta afinidad hacia los antioxidantes lipofílicos, pero no tanto por los hidrofílicos (Isil, Demirata y Apak, 2012).

Fundamento: Se considera que el ensayo DPPH se basa principalmente en una reacción de donación de átomo de hidrógeno (Gulcin, 2012). La reacción se basa en que el radical libre estable DPPH \cdot (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) presenta una coloración púrpura intenso en medio metanólico, su coloración disminuye como consecuencia de la donación de un electrón o captación de un protón de un antioxidante u otro radical hasta tornarlo pardo claro (Peñaloza & Rojano, 2014). El radical cromógeno púrpura (DPPH \cdot) se reduce mediante compuestos

captadores de radicales (AH) a la correspondiente hidracina amarilla pálida (DPPH-H).

2.3.7.2 Ensayo de captación del radical ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS). Fundamento: El ABTS⁺ es un radical no suficientemente estable. La generación del radical cromóforo azul/verde ABTS⁺ se obtiene tras la reacción del ABTS y persulfato de potasio, incubados a temperatura ambiente y bajo oscuridad por 24 horas. Reacciona rápidamente con antioxidantes en los componentes de los alimentos, generalmente dentro de los 30 min. (Gulcin, 2012).

El radical ABTS⁺ es soluble en agua y en disolventes orgánicos, lo que permite la determinación de la capacidad antioxidante de los compuestos hidrófilos y lipófilos. Los radicales ABTS⁺ son más reactivos que los radicales DPPH[•], a diferencia de las reacciones con radicales DPPH[•], que implican SET o HAT, las reacciones con radicales ABTS⁺ generalmente involucran SET (Liang & Kitts, 2014).

2.3.8 Genotoxicidad.

La genotoxicidad, implica cambios que ocurren en la secuencia del ADN o en el nivel de los cromosomas. En este contexto, la formación de mutaciones es el evento crítico que puede conducir a la carcinogénesis. La genotoxicidad incluye la evaluación del daño y reparación del ADN, las mutaciones genéticas, las aberraciones cromosómicas (AC), los micronúcleos (MN), los intercambios de cromátidas hermanas (SCE), la aneuploidía y la poliploidía (Guerreiro & Dinis-Oliveira, 2018).

La genotoxicidad es la capacidad de un agente para producir daño en la molécula de ADN. Este evento tiene varias implicaciones biológicas debido a que el daño genético está muy relacionado con varias

enfermedades, incluido el cáncer. Se ha desarrollado ensayos de genotoxicidad capaces de detectar daños en el ADN en células eucarióticas de fuentes físicas, químicas o biológicas. Dichas metodologías evalúan la rotura del ADN, las aberraciones cromosómicas metafásicas, los intercambios de cromátidas hermanas y el sistema de reparación del ADN (Araki y otros, 2017).

Un agente genotóxico es un agente químico o sustancia que daña el ADN celular. El material genético de una célula se ve afectado en forma negativa por los agentes genotóxicos que alteran el ADN, pudiendo llegar a ser potencialmente mutagénico y/o carcinogénico (Alborghetti y otros, 2014).

Evaluación de la genotoxicidad. Ensayo Tomasevich.

El Ensayo Tomasevich es una modificación del “ensayo cometa” para la evaluación genotóxica *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos frente a ADN genómico; mide roturas de cadenas del ADN en células eucariotas. Los productos luego de la digestión se someten a electroforesis a pH alto, dando estructuras semejantes a cometas, observadas mediante radiación de luz ultra violeta; la cantidad de rupturas de ADN, se evidencia, por la fuerte luminosidad de la cola del cometa en relación con su cabeza (Miranda, 2017). En el registro visual, su fragmentación se clasifica de nivel 0 a 4 (Collins, 2004).

2.3.9 Citotoxicidad.

Los efectos adversos producto de la interferencia con su estructura o la inhibición del crecimiento celular por metabolismo alterado, o ambos, se le denomina toxicidad celular o citotoxicidad (Casado, Mora, Ferrer, Fernández, & Pino, 2016).

Los métodos experimentales utilizados para evaluar la citotoxicidad *in vitro* se fundamentan en dos indicadores, la base biológica y las evidencias de toxicidad. Sobre la base biológica se aplica la muestra a

evaluar. Los cambios sobre las evidencias de toxicidad, se valoran cuantificando la variación que se observan la estructura o fisiología de la base biológica experimental, por inhibición del crecimiento celular por metabolismo alterado o registro del daño o muerte celular. Se clasifican en experimentos de viabilidad y experimentos de supervivencia. El fundamento de los experimentos de viabilidad se basa en que las células tienen la posibilidad de excluir sustancias, manteniendo la integridad de la membrana; mide la tasa de supervivencia directa de las células al ser sometidas a un colorante. Se evalúa la citotoxicidad calculando la concentración letal 50 (CL₅₀) que representa la concentración de la sustancia estudiada que origina la muerte del 50% de células presente, la evaluación es inmediatamente luego del tratamiento (Contreras, 2015).

Cultivo celular.

El cultivo celular engloba diferentes métodos experimentales para mantener al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas de las células *in vitro*. La finalidad primordial del cultivo celular tiene como principal objetivo mantener vivas a células de diferente origen, animal, vegetal, bacteriano fuera de su organismo de origen. Su origen es en el siglo XIX, cuando se iniciaron estudios detallados de tejidos y órganos en vasos de vidrio; tras la incorporación de modificaciones que dieron lugar a medios de cultivo más perfeccionados, se hizo posible el cultivo de células tumorales procedentes de muestras de tejidos malignos tanto del hombre como animales, permitido conocer el comportamiento *in vitro* de las células cancerosas (Churampi, 2016). “La mayoría de las células en cultivo, provenientes de tejidos sólidos, crecen en monocapa, adheridas a una superficie, y después de subcultivar (transferir células de un recipiente de cultivo a otro), requieren volver a adherirse al sustrato antes de proliferar” Entre las principales ventajas encontramos: (a) el manejo en condiciones controladas es factible (b) también se puede usar células animales, (c) en el estudio de

los mecanismos celulares se pueden utilizar como modelos (d) las células pueden conservarse congeladas en nitrógeno líquido a -196°C por un tiempo indefinido de tiempo con mínima pérdida de viabilidad al ser descongeladas, e) fácil acceso a diversas líneas celulares en bancos internacionales. (f) economía en el uso de reactivos y compuestos (Beltran y Gonzáles, 2016).

La senescencia, un estado de detención permanente del ciclo celular, desempeña un papel importante en la supresión de tumores, la tumorigénesis y el envejecimiento. Lo distintivo de la senescencia celular es la detención del crecimiento, causada principalmente por la activación de los inhibidores del ciclo celular y los supresores de tumores, por lo que las células que carecen de características de senescencia son propensas al cáncer. Este límite de reproducción puede deberse a un acortamiento progresivo de los telómeros, o como consecuencia de la activación de mecanismos denominados “puntos de control” (check points) del ciclo celular. (Moneo, 2009)

Normalmente los cultivos se conservan en recipientes de plástico o de vidrio, con una superficie que permite la adhesión de las células, para evaluar el crecimiento celular, las células son tripsinizadas para arrancarlas de la placa de cultivo y contarlas utilizando procedimientos citométricos. Los cultivos de células cancerosas poseen algunos aspectos diferenciales al compararnos con cultivos de células normales, pueden crecer sin fijarse a ninguna superficie y proliferar en una placa de cultivo hasta una densidad mucho mayor que las células normales (Martinez & Navarro, 2003).

La curva de crecimiento de un cultivo de células cuando son sembradas a baja densidad, consta de tres fases: una fase de latencia, seguida de una fase exponencial (Log) y, finalmente, una fase estacionaria. La fase log se ajusta a una recta, cuya pendiente indica el grado de proliferación celular que ha logrado adaptarse. Cuando se detiene la actividad de multiplicación la pendiente de la curva comienza aplanarse (Merentes, 2016).

Líneas celulares.

El Instituto nacional del cáncer (NCI) en el año 1990 introduce las llamadas líneas celulares de tumores sólidos humanos. El catalogo inicial de éstas, contiene una amplia variedad de 60 líneas celulares de diverso origen tisular, comprendiendo siete tipos de cánceres (cerebro, colon, leucemias, pulmón, melanoma, ovario y renal). Las líneas celulares de origen animal o humano que se han adaptado a vivir en condiciones de cultivo, han modificado sus características de crecimiento con la habilidad de proliferación ilimitada al sufrir una fase de transformación en forma espontánea o inducido por radiaciones, virus o compuestos químicos. Las líneas celulares comprenden dos formas principales: adherentes (células en monocapa) que deben separarse, antes de utilizarlas; y no adherentes (células en suspensión). (Contreras, 2015).

Las células de cáncer de próstata humano DU-145 procede originalmente de una metástasis cerebral, fue aislado de una lesión en el cerebro de un paciente con carcinoma metastásico de la próstata y no expresan el antígeno prostático específico. DU-145 (Hernández, 2016). La línea celular HT-29 de adenocarcinoma colon rectal (ATCC® HTB-38™) es originaria de un adenocarcinoma de colon humano y fue establecida en 1975 (Fuchs, 2008).

2.3.10 Evaluación de la citotoxicidad. Ensayo de sulforodamina B.

El ensayo de sulforodamina B (SRB) se desarrolló para ser utilizado en el programa de descubrimiento de fármacos anticancerosos del National Cancer Institute (NCI). Se fundamenta en la capacidad de sulforodamina B (SRB) al 1% de ácido acético, de unirse a los componentes proteicos de las células. La SRB es un colorante aminoxanteno rosa brillante con dos grupos sulfónicos que se unen electrostáticamente a los residuos de

aminoácidos básicos de proteínas bajo condiciones ligeramente ácidas, y se disocian en condiciones básicas (Skejan y otros, 1990).

SRB se une a los residuos de aminoácidos básicos de proteínas de las células, La proteína comúnmente causa desprendimiento y pérdida de células. Para evitar este problema potencial, los cultivos se fijaron con ácido tricloro acético (TCA) antes del lavado. Al final del período de tinción, se eliminó la SRB sin unir los cultivos al enjuagar rápidamente por cuatro veces con ácido acético al 1%. El ácido acético se vertió directamente en los pozos de cultivo en un cubilete. Este procedimiento permitió que el enjuague se realizara rápidamente, de modo que no se produjo la desorción de tinte unido a proteínas Posteriormente puede ser extraído cuantitativamente de las células y solubilizado para la medición de la densidad óptica (DO) por Tris pH 10,5. La unión de SRB es estequiométrica, la cantidad de tinte extraído de las células teñidas es directamente proporcional a la masa celular. La fuerte intensidad de la tinción SRB permite que el ensayo sea realizado en un formato de 96 pocillos. El ensayo puede detectar densidades tan bajas como 1,000-2,000 células por pozo. (Vichai & Kirtikara, 2006).

El ensayo SRB proporciona un método sensible para medir la citotoxicidad en cultivo de fármacos. En un estudio piloto in vitro sobre descubrimiento de fármacos contra el cáncer, el ensayo SRB se utilizó para examinar las sensibilidades diferenciales de 60 líneas de células tumorales humanas a más de 1,000 compuestos de ensayo. (Skejan y otros, 1990).

La inhibición del crecimiento (IG_{50}) es una medida de la citotoxicidad in vitro. Esto se define como la concentración que reduce un 50% el crecimiento celular en comparación con el control sin fármaco. En el National Cancer Institute NCI, se definió el IG_{50} (concentración que causa la inhibición del crecimiento del 50%). El IG_{50} se corrige para el recuento de células en el tiempo cero (comienzo de la exposición al fármaco (Tume, 2017)).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño del Estudio.

El tipo de estudio fue de enfoque cuantitativo, con diseño observacional analítico y experimental (Ramón, 2016).

3.2 Población de estudio.

Rizoma de *Curcuma longa* L.

3.3 Muestra.

Extracto crudo y etanólico

3.4 Material Biológico:

Línea celular de ratón: 3T3 (fibroblastos normales de ratón)

Línea celular humana DU-145 (adenocarcinoma de próstata) y

Línea celular humana HT-29 (carcinoma de colon humano).

ADN genómico humano.

3.5 Reactivos.

Los reactivos difenilpicril hidrazilo (DPPH); ácido 2,2- azinobis-3-etil benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), persulfato de potasio, ácido (\pm)-6-hidroxi-

2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (TROLOX); ácido gálico; reactivo Folia Ciocalteu, ácido tricloroacético (ATC); curcumina, gentamicina, medio de cultivo DMEM (Dulbecco modified Eagle médium), MEM (Minimum Essential Médium) suplementado con 10% de suero bovino fetal, tripsina, EDTA, Dimetilsulfóxido (DMSO), solución 10 mM de Tris base (Tris (hydroximetil) aminometano) (pH 10,5), 5-*fluorouracilo* y sulforodamina B (SRB) fueron de Sigma-Aldrich. Los reactivos carbonato de sodio, metanol absoluto de laboratorios Merck. Los demás reactivos fueron también de grado analítico: Alcohol y persulfato de potasio de JT Baker Chemical, bromuro de etidio al 1%.

3.6 Equipos.

Potenciómetro HANNA modelo HI 8424, baño maría, equipo de flujo laminar vertical clase 2 StenilGard III Baker, microscopio óptico invertido, agitador de placas Tetramax Heidolph, lector ELISA (Bio-Rad modelo 450), estufa marca UNICS, estufa NuAire, espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 Merck, molino Arthur H. Thomas CO, standard Model ROY Willey Mill, balanza analítica OHAUS (220 mg d= 0,1 mg), agitador Vortex Scilogex Mx-s, refractómetro ATAGO ® 43125, Micro pipetas MCR-100 y AXYGEN, pipetas multicanal Thermo, hemocitómetro o cámara de Neubauer, picnómetro marca ADAM modelo HCB 123, cámara de electroforesis Biometra®, Biometra *UVsolo TS*, un transiluminador UV marca Ultra Lum, cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD.

3.7 Preparación de los extractos

3.7.1 *Recolección y preparación de la muestra vegetal.*

El rizoma de la especie *Curcuma longa* L. “palillo” fue recolectada de la Provincia de Chanchamayo, Departamento de Junín, por el Blgo. Especialista Taxónomo Mg. Cesar A. Grandéz Ríos.

3.7.2 *Clasificación de la muestra.*

La clasificación taxonómica del rizoma fue certificada por el Blgo especialista Taxónomo Mg. Cesar A. Grandéz Ríos, de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et al., 1981. (Anexo 1).

3.7.3 *Obtención del extracto crudo y extracto etanólico.*

3.7.3.1 Obtención del extracto crudo. El rizoma fresco pelado y pesado fue procesado por extractor Philips, obteniéndose el extracto crudo; fue evaporado hasta sequedad en una estufa a temperatura no mayor de a 40° C. El extracto seco obtenido se guardó en un recipiente apropiado, frasco de color ámbar rotulado, para protegerlo de la luz y humedad. El extracto seco obtenido se empleó en los experimentos fitoquímicos, bioquímicos y biológicos.

3.7.3.2 Obtención del extracto etanólico. El rizoma de la planta se limpió, pelo y posteriormente se llevó a secar en una estufa a temperatura no mayor de 40°C. Posteriormente se realizó la molienda en un molino de cuchillas (Arthur H. Thomas

CO, standard Modelo ROY Willey Mill), obteniéndose un polvo seco y homogéneo; posteriormente se pesó y macero en etanol al 96% en una proporción 2:1 de rizoma y solvente, durante 28 días en un frasco de color ámbar a temperatura ambiente, con movimientos rotatorios durante 15 minutos cada día.

Al finalizar la maceración, se filtró con capas de gasa, la solución filtrada fue evaporada hasta sequedad en una estufa a 40° C. El extracto seco obtenido se empleó en los experimentos fitoquímicos, bioquímicos y biológicos.

Todos estos procesos de obtención del extracto crudo y etanólico fueron realizados en el Laboratorio de Investigación de la Sección de Farmacología de la Facultad de Medicina Humana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

3.8 Método experimental

3.8.1 *Evaluación de las Parámetros Fisicoquímicos del extracto crudo y etanólico de la pulpa del rizoma Curcuma longa L.*

3.8.1.1 Determinación de la Densidad relativa. Definida como el peso de 1 mL de cada extracto preparado. Se utilizó un picnómetro marca ADAM modelo HCB 123 se pesó en una balanza analítica OHAUS (220 mg d= 0,1 mg), luego se agregó 10 mL de agua destilada, se enraso al nivel requerido y se procedió a pesar. Se repitió el procedimiento con ambos extractos. La diferencia de pesos determinó la densidad relativa. Se realizó por triplicado.

$$D = \frac{P_2 - P}{P_1 - P}$$

P = peso (g) del picnómetro vacío.

P₁ = peso (g) del picnómetro lleno con agua destilada.

P₂ = peso (g) del picnómetro lleno con el extracto.

3.8.1.2 Determinación de Sólidos totales. Los sólidos totales se determinaron por método gravimétrico, realizando la evaporación de la muestra problema hasta obtener un residuo seco de peso constante. Se precisó por diferencia entre el peso de la placa Petri con 5 mL de cada extracto (llevado a una estufa a 105°C hasta peso constante) y el peso de la placa Petri vacía. Se utilizó una balanza analítica OHAUS (220 mg d= 0,1 mg). La determinación se ejecutó por triplicado.

3.8.1.3 Determinación de Índice de Refracción (IR) y Grados BRIX. El refractómetro de grados BRIX (ATAGO ® 43125) se procedió a calibrar con agua destilada, intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro. Luego de realizar el ajuste del refractómetro, se colocó 50 µL del extracto y se enfocó hasta centrar la línea horizontal dentro del círculo de medición visual. La determinación se realizó por triplicado.

3.8.1.4 Determinación de pH. Se determinó utilizando el potenciómetro HANNA modelo HI 8424 previamente calibrado con soluciones buffer de pH 2,4 y 7,0. La determinación se hizo por triplicado.

3.8.1.5 Prueba de solubilidad. Se utilizó 12 tubos de ensayo donde se ubicó 30 mg de cada extracto seco del rizoma de *Curcuma longa* L., se adiciono a cada tubo 1 mL de solvente: benceno, acetona, butanol, etanol, metanol, agua destilada, hexano, cloroformo, acetato de etilo, éter etílico y éter de petróleo. Se agitó y observó los resultados.

Tabla 1. Criterios para presentar niveles solubilidad de extractos

Solubilidad	Observaciones
Muy soluble	No se observa sólido
Soluble	Se observan partículas muy pequeñas
Ligeramente soluble	El sólido disminuye de tamaño considerablemente
Muy poco soluble	El sólido no disminuye de tamaño pero el solvente se torna ligeramente de color
Insoluble	No hay reducción del tamaño del sólido ni tinción del solvente.

Adaptada. Fuente: Miranda, 2019.

3.8.2 Tamizaje *fitoquímico*: *Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios.*

La determinación cualitativa de metabolitos secundarios del extracto seco de *Curcuma longa* L. “palillo” se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Se utilizaron reactivos específicos para la identificación de los diversos metabolitos, aplicando las técnicas de Lock de Ugaz (2016).

- a. Reacción de Molisch: Gotas de muestra problema + gotas del R. de Molisch “A” (alfa naftol en alcohol), agitar + H₂SO₄ concentrado por las paredes del tubo. La reacción será positiva, carbohidratos, cuando se forme en la interfase un anillo de color violeta.
- b. Reacción de Ninhidrina: Gotas de muestra problema + reactivo de Ninhidrina (Ninhidrina al 1% en etanol). Baño maría por 10 minutos. La aparición de un color violáceo indica la presencia de aminoácidos libres y grupos amino.

- c. Reacción de Shinoda: Gotas de muestra problema + reactivo de Shinoda (Magnesio + gotas de HCl concentrado). La presencia de un color amarillo nos indica positivo para flavonoides.
- d. Reacción de FeCl_3 : Gotas de muestra problema + reactivo de FeCl_3 . Si la solución se torna azulada será positivo para compuestos fenólicos.
- e. Reacción de Lieberman - Burchardat: Gotas de muestra problema + reactivo de Lieberman-Burchardat (gotas de cloroformo + gotas de anhídrido acético + gotas de H_2SO_4 concentrado). La presencia en zona de color verde o azulado es predominio de esteroides; la coloración pardo-naranja o rojo nos indicará presencia de triterpenoides.
- f. Reacción de Borntrager: Gotas de muestra problema + reactivo de Borntrager (gotas de hidróxido de sodio 5%). La presencia de color rojo evidencia antraquinonas.
- g. Reacción de Mayer: Gotas de muestra problema + gotas de R. Mayer (tetrayodomercuriato potásico) en medio ácido. La presencia de turbidez o precipitado blanco evidencia alcaloides.
- h. Reacción de Dragendorff: Gotas de muestra problema + gotas de reactivo Dragendorff (tetrayodobismutatopotásico) en medio ligeramente ácido. La evidencia de precipitado naranja o rojo naranja indica presencia de alcaloides.
- i. Reacción de saponina: 0,5 mL de muestra problema + 2 mL de agua destilada, agitar fuertemente por 15 segundos y dejar en reposo 1 minuto. La presencia de espuma por más de 0,5 a 1 cm y persistente evidencia reacción positiva.
- j. Reacción de Vainillín sulfúrico: Gotas de muestra problema + gotas de reactivo de Vainillín sulfúrico. La formación en zona de anillo rojizo violáceo evidencia glucósidos.

- k. Reacción de la gelatina: 1 mL del reactivo de gelatina (gelatina en agua, con g de NaCl) + gotas de la muestra problema. Un precipitado denso blanquecino evidencia taninos.
- l. Reacción de antrona: Gotas de muestra problema + 10 gotas de reactivo de antrona (antrona en H_2SO_4). Presencia de anillo verde azulada en la interfase será positivo para compuestos carbohidratos.
- ll. Reacción de Fehling: 0,5 mL de muestra problema + 5 gotas de reactivo Fehling A (Sulfato de cobre) + 5 gotas de reactivo Fehling B (tartrato de potasio y sodio con solución de NaOH al 40 % y agua). Colocar a baño maría por 10 minutos. Precipitado rojo ladrillo indica positivo a carbohidratos.
- m. Reacción de Rosenheim: 0,5 mL de muestra problema + 3 gotas de reactivo Rosenheim. Presencia de precipitado rojo pardo indica presencia de flavonoides catéquicos.
- n. Reacción de Bertrand: Gotas de muestra problema + gotas H_2SO_4 + gotas de R. de Bertrand (ácido sílico-túngtico). Precipitado blanco lechoso indica positivo a alcaloide.
- ñ. Reacción de Sonnenschein: gotas del extracto + gotas H_2SO_4 + gotas de reactivo Sonnenschein (ácido fosfo-molibdico). Precipitado verde azulado indica positivo a alcaloide.
- o. Reacción de hidroxilamina: 0,5 mL de muestra problema + 3 gotas de reactivo (clorhidrato de hidroxilamina en metanol con anaranjado metilo). Precipitado rojizo indica positivo a compuestos carbonilo.

3.8.3 Determinación de la actividad antiradical libre. Evaluación de la cuantificación de polifenoles totales.

3.8.3.1 Determinación de Fenoles Totales. Ensayo de Folin Ciocalteu. El fundamento es que el reactivo principal del ensayo de Folin-Ciocalteu consiste de una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, de color amarillo; al reducirse en presencia de polifenoles forma un complejo de Mo(V) que presenta una coloración azul cuya absorbancia se mide a una longitud de onda de a 760 nm (Muñoz-Bernal y otros, 2017).

Procedimiento

1. Se inició con una solución de 24 µg/mL del extracto etanólico y 11 µg/mL del extracto crudo de *Curcuma longa* L. “palillo” se prepararon diluciones con etanol al 96 % de ambos extractos, resultando concentraciones en el tubo de reacción de 24,00 a 6,00 µg/mL y 11,00 a 2,75 µg/mL respectivamente.
2. Los estándares antioxidantes utilizados fueron: ácido gálico y curcumina. Se preparó una curva patrón con cada estándar. Las concentraciones finales en el tubo de reacción fueron de 8,16 a 1,02 µg/mL y 32,64 a 3,06 µg/mL respectivamente.

El procedimiento para cada dilución de las muestras problema y los estándares, se realizó según tabla 2.

Tabla 2. Determinación de polifenoles. Método Folin-Ciocalteu.

Tubos	Blanco de reactivo	Ácido Gálico	Curcumina	Muestra problema
mL Agua destilada	0,1			
mL Folin-Ciocalteu	0,5	0,5	0,5	0,5
mL Ac Gálico		0,1		
mL Curcumina			0,1	
mL MP				0,1
mL Na ₂ CO ₃	0,4	0,4	0,4	0,4

La solución de Na₂CO₃ al 7,5 % se adiciono luego de agitación y reposo de uno a tres minutos. La mezcla de la reacción se colocó a baño maría a 45°C por 15 minutos; se retiró y dejo a oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos. Se realizaron las lecturas a 760 nm.

La concentración de fenoles totales del extracto se expresa en µg de equivalente de ácido gálico (EAG) por mg de extracto.

3.8.3.2 Ensayo de captación del radical DPPH. Según (Brand-Williams et al, 1995) con modificaciones. Los reactivos: Solución de DPPH 40 mg% en metanol, se ajustó la absorbancia del radical DPPH a un valor de absorbancia de 0,9 ± (0,02) a una longitud de onda de 517 nm.

Procedimiento:

1. Se inició con una solución de 125 µg/mL del extracto etanólico y 476,2 µg/mL del extracto crudo de *Curcuma longa* L. “palillo” se prepararon 5 diluciones en etanol al 96 % de ambos extractos, cuyas concentraciones resultantes

en el tubo de reacción fueron de 1,5625; 3,125; 6,25; 12,50 y 25,00 $\mu\text{g/mL}$ y 5,00; 25,00; 50,00; 75,00 y a 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

2. Se utilizó como estándares antioxidantes Trolox y Curcumina. Se realizó la curva patrón con cada estándar. Las concentraciones finales de Trolox en el tubo de reacción fue de 1,25; 2,50; 3,75; 5,00 y 6,25 $\mu\text{g/mL}$ y 1,84; 3,68; 5,53; 7,37 y 9,21 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

El proceso para cada dilución de las muestras problema y los estándares, se realizó según la tabla 3.

Tabla 3. Determinación del IC_{50} de *Curcuma longa* L. y estándares. Método DPPH.

Tubos	Blanco de muestra	Control DPPH	TROLOX	Curcumina	Muestra problema
mL Etanol	0,6	0,3			
mL DPPH		0,6	0,6	0,6	0,6
mL Trolox			0,3		
mL Curcumina				0,3	
mL MP	0,3				0,3

Las muestras problemas en solución y los estándares se realizaron por triplicado para obtener un promedio de absorbancias. La reacción se llevó a cabo protegido de la luz por 30 minutos, posteriormente fueron leídos en el espectrofotómetro a 517 nm.

Con los promedios se edificaron las respectivas curvas de calibración. Los resultados se expresaron en % de captación de radicales libres, IC_{50} y Capacidad antioxidante equivalente a

TEAC para ambos extractos y los estándares Trolox y curcumina.

3.8.3.3 Ensayo de captación del radical ABTS+ según (Re y col, 1999) con modificaciones Se preparó una solución stock 7 mM de ABTS. El radical catiónico ABTS⁺ fue preparado al reaccionar la solución stock con solución de persulfato de potasio 2,45 mM (concentración final) en una proporción de 2:1; la solución se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante un tiempo de reposo de 12 a 16 horas en oscuridad. Esta solución se diluye con etanol para preparar la cantidad necesaria del radical ABTS⁺; ajustamos la absorbancia del mismo a $0,7 \pm (0,02)$ a una longitud de onda de 734 nm.

Procedimiento:

1. De una solución de 50 µg/mL del extracto etanólico y 200 µg/mL del extracto crudo de *Curcuma longa* L. “palillo” se prepararon 5 diluciones en etanol al 96 % de ambos extractos, obteniendo concentraciones en el tubo de reacción fueron de 1, 50; 3,00; 6,25; 12,50 y 25,00 µg/mL y 6,25; 12,50; 25,00; 50,00 y a 100 µg/mL respectivamente
2. Los estándares antioxidantes utilizados fueron: Trolox y Curcumina. Se preparó una curva patrón con cada estándar. Las concentraciones finales en el tubo de reacción fueron de 0,63; 1,25; 2,50; 3,75 y 5,01 µg/mL; y 0,92; 1,84; 3,68; 5,53 y 6,82 µg/mL respectivamente.

La tabla 4 esquematiza el procedimiento para cada dilución de las muestras problema y los estándares.

Tabla 4. Determinación del IC₅₀ de *Curcuma longa* L. y estándares. Método ABTS.

Tubos	Blanco de muestra *	Control ABTS	TROLOX	Curcumina	Muestra problema
mL Etanol	1,5	0,5			
mL ABTS		1,5	1,5	1,5	1,5
mL Trolox			0,5		
mL Curcumina				0,5	
mL MP	0,5				0,5

* El tubo blanco de muestra se preparó con soluciones de muestra y curcumina

Por 30 minutos se protegió de la luz, luego se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 734 nm.

Las muestras problemas en solución y los estándares se procesaron por triplicado.

Con los promedios obtenidos se edificaron las respectivas curvas de calibración.

Los resultados se expresaron en % de captación de ABTS, IC₅₀ y Capacidad antioxidante equivalente a TEAC para ambos extractos y curcumina.

Porcentaje de captación de radicales libres, está referido al porcentaje de reducción del radical DPPH/ABTS que presenta el extracto a una concentración determinada.

$$\% \text{ de captación de radicales libres (\%CRL)} = \left[\left[1 - \frac{(Abs \text{ M.P.} - Abs \text{ Blanco M.P.})}{Abs (DPPH)} \right] \times 100 \right]$$

IC₅₀, definido como la cantidad del extracto con capacidad antioxidante o sustancia antioxidante de referencia, capaz de reducir al 50% la concentración inicial del radical. Este IC₅₀ se determinó por la ecuación de la recta obtenida de la gráfica de la curva de calibración.

Capacidad antioxidante equivalente al Trolox. (TEAC). - Se obtiene de la relación entre el valor de IC₅₀ del Trolox respecto a la IC₅₀ del extracto de *Curcuma longa* L. (Re y otros, 1999).

$$\text{TEAC} = \frac{\text{IC}_{50}\text{Trolox}}{\text{IC}_{50}\text{C.longa L.}}$$

3.8.4 Ensayos de genotoxicidad in vitro, “Método Tomasevich”

El experimento se desarrolló en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú. Se realizó los protocolos descritos en Miranda con las siguientes fases:

3.8.4.1 Fase de cuantificación y preparación de stock de ADN genómico obtenido para el ensayo. El ADN genómico humano fue proporcionado por el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; a una concentración de 1,500 ng/μL en un volumen final de 200 μL, respectivamente, para cada ensayo..

3.8.4.2 Fase de ensayo de genotoxicidad in vitro extracto del rizoma de *Curcuma longa* L. sobre el ADN genómico humano. Del extracto seco del rizoma de *Curcuma longa* L., se procedió a preparar las soluciones a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 mg/mL, respectivamente; utilizando agua bidestilada estéril como solvente.

Se preparó las mezclas para los ensayos de genotoxicidad in vitro de ADN genómico, de acuerdo a la tabla 5.

Tabla 5. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto del rizoma de *Curcuma longa* L. y curcumina, sobre ADN genómico humano.

Condiciones		Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>								
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6	7 B	8 C	9 C/PK
Stock de ADN (1,500 ng/μL)		14	14	14	14	14	14	-	20	14
Volumen en μL										
Extracto de rizoma de “cúrcuma”	(mg/mL)	5	10	25	50	100	200	200	-	200
	(μL)	6	6	6	6	6	6	-	-	6
Proteínasa K		-	-	-	-	-	-	-	-	6
Volumen total (μL)		20	20	20	20	20	20	20	20	26
Incubación en baño María a 37 °C						1 hora				

C/PK: control enzima proteínasa k

C: control ADN

3.8.4.3 Fase de electroforesis. Se preparó el gel de agarosa al 1% en la solución de TAE 50X (buffer Tris Acetato EDTA); luego se colocó en una cámara de electroforesis Biometra®. Las muestras se prepararon con la mezcla de soluciones problemas (5 a 200 mg/mL) y loading (azul de bromofenol, xileno cialeno y naranja G) en proporción 8:2. Luego se realizó la carga de los volúmenes en los pocillos del gel de agarosa, según las cantidades descritas en la tabla 6.

Tabla 6. Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN genómico humano, con extracto del rizoma de *Curcuma longa* L. y Curcumina, para el ensayo de genotoxicidad *in vitro*.

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>									
Nº carril del gel		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	(mg/mL)	Marcador molecular	5	10	25	50	100	200	B	C	C/PK
Muestra	(µL)	3	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Loading	(µL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Volumen total	(µL)	5	10	10	10	10	10	10	10	10	10

C/PK: control enzima proteinasa k

C: control AND

El Buffer de corrida en cámara de electroforesis fue TAE 1X a pH 8; se les programó a 30 voltios (V) para tres horas de corrida.

3.8.4.4 Fase de lectura por radiación UV. Transcurrido el tiempo de corrido electroforético, se sumergió el gel de agarosa en solución de bromuro de etidio al 1% durante quince minutos aproximadamente, se enjuagó con abundante agua destilada dos veces y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó el gel de agarosa en radiación de luz ultra violeta 254 nm, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS.

Asimismo, se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.

3.8.4.5 Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad. La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN por la genotoxicidad, visualizados en el registro fotográfico, fueron

basados en la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Collins (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

Clase	Genotoxicidad
0	Fragmentación de ADN < 5%
1	Fragmentación de ADN entre 5 a 20%
2	Fragmentación de ADN entre 20 a 40%
3	Fragmentación de ADN entre 40 a 95%
4	Fragmentación de ADN >95%

Fuente: Collins, A. (2004). *Molecular Biotechnology*. Vol. 26.

Hipótesis:

El porcentaje de fragmentación del ADN genómico humano, revela el grado de genotoxicidad, formulándose la hipótesis:

H₀: Todas las medianas son iguales

H₁: Al menos una mediana es diferente

3.8.5 Bioensayo del efecto antitumoral in vitro

3.8.5.1 Obtención de las líneas celulares. La línea celular humana DU-145 (adenocarcinoma de próstata), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y línea celular de ratón: 3T3 (fibroblastos normales de ratón) fueron proporcionados por los laboratorios de investigación y desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (distrito de San Martín de Porres, Lima, Perú) que fue obtenida de Colección Americana de Cultivos (ATCC). El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular y Virología de Los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (LID-UPCH).

Las líneas celulares DU-145 y HT-29 fueron cultivadas y mantenidas en el medio de cultivo MEM (Minimum Essential

Médium) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 50 µg/mL de gentamicina. La línea celular 3T3 creció en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco modified Eagle médium).

En un equipo de flujo laminar vertical clase 2, antes de realizar el ensayo, se retiró el medio de las mono capas celulares lavando las células una vez con 5 mL de una solución de “HANKS” de Sigma Aldrich sin calcio y magnesio, con sales balanceada de bicarbonato de sodio por 4 veces para activarlas. Posteriormente se agregó 1 mL de la solución de tripsina-EDTA para cubrir uniformemente la superficie de crecimiento celular, que se eliminó luego de diez segundos. Se incubó en frasco de cultivo celular por 10 minutos. Cumplido el tiempo se volvió a lavar y fue resuspendido en 3 mL del medio de cultivo mezclando para obtener una suspensión celular homogénea. Se procedió a realizar el conteo del número de células en un hematocitómetro o cámara de Neubauer con ayuda del microscopio óptico invertido.

Tabla 8. Número y concentración de células por pozo.

Línea celular	N.º de células/ pozo	N.º de células/38mL
3T3	3,000	712,500
DU-145	1,500	356,250
HT-29	3,000	712,500

3.8.5.2 Ensayo de citotoxicidad. Se utilizaron las líneas celulares: DU-145 (adenocarcinoma de próstata, 4,000 células/pocillo), 3T3 (células de fibroblasto de ratón, 3,000 células/pocillo), HT-29 (adenocarcinoma de colon, 4,000 células/pocillo).

Se inoculo 160 µL de cada tipo de línea celular en placas de cultivo de células de 96 pozos y se incubo a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂ y 95 % de aire por 24 h para

permitir que las células se fijen a las placas. Cada placa que contenía cada una de las líneas celulares fue fijada con ácido tricloroacético (TCA) al 20 % para obtener luego los valores de las células a tiempo cero, antes de añadir los extractos.

Para elaborar las diluciones de los extractos crudos y etanólico, se mezcló inicialmente 5 mg de cada extracto con 40 μ L de DMSO, se agito con Vórtex por 6 minutos. Concentración del stock (12,5mg/100 μ L).

Cada pocillo recibió 40 μ L de cada dilución seriada. Los pozos de la placa cero reciben 40 μ L de MEM. Se homogenizo con agitador de placas Heidolph por 30 segundos y se procedió a incubar por 48 horas adicionales. Luego del tiempo transcurrido, se retiró las placas de la incubadora y se agregó 100 μ L de ATC al 20 % para detener el ensayo, se colocó a refrigeración a 4 °C por 1 hora. Se eliminó el ATC y se lavó cada placa por 5 veces con 500 mL de agua cada vez, se drenó el exceso de agua, se secó el exceso de agua con papel toalla y las placas se dejaron secar completamente por secado convectivo por 10 minutos.

3.8.5.3 Evaluación de la actividad antitumoral. Tras la exposición de las líneas celulares a los extractos crudos, etanólico y curcumina; se determinaron las células de supervivencia basado en el ensayo SRB.

La determinación de la inhibición del crecimiento celular, se realizó mediante el ensayo de sulforodamina B (SRB), estima indirectamente el número de células viables por ser capaces de teñir la proteína celular total con el colorante SRB (Vichai & Kirtikara, 2006).

Se agregó 50 μ L de SRB al 0.2 % en ácido acético al 1% a las células fijadas con TCA en cada pozo, si presentaban burbujas se eliminaban; las placas se colocaron en el agitador Tetramax

Heidolph por 30 segundos, luego se retiraron y se dejaron en reposo al medio ambiente por 30 minutos. El exceso del colorante SRB no ligado a proteínas se retiró con un lavado rápido con 50 mL de ácido acético al 1% por cuatro veces; la eliminación se realizó con movimientos fuertes, casi bruscos de las placas sobre un fregadero para asegurar la eliminación completa de la solución de enjuague. Después de enjuagarse, las placas de cultivos se airearon. Luego de secar las placas (hasta que no se observó humedad permanente), el colorante SRB unido a las proteínas se diluyó con una solución 10 mM de Tris base (Tris (hydroximetil) aminometano (pH 10,5) y se dejó en agitación a 1200 rpm por 5 minutos en el agitador de placas. Finalmente, se determinó la Densidad Óptica que es directamente proporcional a la viabilidad celular de un lector de micro placas a 510 nm usando un lector ELISA (Ibo-Rad modelo 450). Se utilizó 5-fluorouracilo, un fármaco antitumoral, como control positivo, mientras que las células sin tratar fueron utilizadas como controles negativos. El valor de IG_{50} , definido como la concentración del extracto que inhibe el 50% del crecimiento celular fue determinado a partir del análisis de la regresión lineal. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.9 Análisis de datos.

El tratamiento estadístico se realizó luego de obtener todas las medidas por triplicado al agruparse en tablas con Excel 2013 y SPSS 21. Para las pruebas de capacidad antioxidante y antitumoral, los valores de IC_{50} y sus intervalos del 95% de confianza fueron obtenidos por regresión lineal. En el caso de daño genotóxico, se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de $p \leq 0,05$, se consideró como el nivel estadísticamente significativo.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados.

Los resultados para ambos extractos se presentan en tablas: caracterización fisicoquímica, solubilidad, tamizaje fitoquímico, cuantificación de polifenoles, IC_{50} para DPPH y ABTS, capacidad antioxidante equivalente a Trolox, correlación de la capacidad antioxidante con las dos técnicas aplicadas frente al contenido de polifenoles, evaluación de la capacidad genotóxica, evaluación de la capacidad antitumoral (IG_{50}).

4.1.1 *Caracterización fisicoquímica.*

Los resultados sobre la caracterización fisicoquímica del extracto crudo de *Curcuma longa* L. mostró que la densidad del agua fue ligeramente inferior a la densidad aparente del extracto (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de la caracterización fisicoquímica del extracto crudo y etanólico de *Curcuma longa* L.

	Extracto crudo	Extracto etanólico
Densidad relativa a 20.1 °C (g/mL) ± DS	0,814 ± 0,001	1,054 ± 0,010
Sólido Totales (mg/mL) ± DS	160,3 ± 0,007 ^a	23,97 ± 0,010 ^a
Índice de Refracción ± DS	1,341 ± 0,001	1,367 ± 0,708
Grados Brix ± DS a 20.1 °C	5,717 ± 0,029 ^a	21,93 ± 0,708 ^a
pH ± DS a 20.1 °C	5,9 ± 0,01	6,293 ± 0,006

a: p = 0,005

Los grados Brix se refieren a los sólidos solubles totales en el rizoma de la planta. Los resultados muestran un valor adecuado de grados Brix para ambos extractos.

El pH es ácido para ambos casos, siendo el extracto crudo más ácido que el etanólico, 5,9 y 6,29 respectivamente. Podemos inferir que la mayor acidez del extracto crudo es debida a la solvatación por presencia del agua natural en el extracto crudo y los metabolitos secundarios a diferencia del etanólico que ha sido deshidratado en el proceso de extracción.

Los resultados sobre solubilidad del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. se presentan en tabla 10 de acuerdo a criterios para presentar niveles solubilidad de extractos (Tabla 1).

Tabla 10. Resultados del ensayo de solubilidad.

	Extracto crudo	Extracto etanólico
Agua	Ligeramente soluble	Insoluble
Etanol	Soluble	Soluble
Metanol	Soluble	Muy soluble
Butanol	ligeramente soluble	Soluble
Cloroformo	Soluble	Soluble
Hexano	Muy poco soluble	insoluble

Ambos extractos son solubles en los diferentes solventes polares, como los alcoholes: etanol, metanol y butanol debido a la fenoles presentes; hay diferencia entre el extracto etanólico y el extracto crudo debido a la mayor cantidad de polifenoles, evidenciados en el tamizaje fitoquímico. El solvente medianamente polar, cloroformo, realiza una buena extracción. Los curcuminoides son compuestos conformados con un elevado número de carbonos y tienen mayor polaridad por la presencia de grupos –OH y la capacidad de formar puentes de hidrógeno; por lo cual es más soluble en etanol puro que al agua (Alvis, Arazola y Martinez, 2012).

4.1.2 Tamizaje Fitoquímico.

En la tabla 11 se muestran los resultados del tamizaje fitoquímica realizado a los extractos crudo y etanólico donde se muestra los principales metabolitos presentes en los extractos de pulpa del rizoma de *Curcuma longa* L.; con un contenido moderado en el extracto crudo y destacando abundante contenido de fenoles, carbohidratos, alcaloides y heterósidos, en el extracto etanólico ; asimismo, contenido moderado de flavonoides en ambos extractos; moderado contenido de compuestos triterpenoides en el extracto etanólico y poco en el extracto crudo; poco contenido de taninos y antraquinonas en el extracto etanólico y crudo; en tanto que en ninguno de los dos extractos se hallaron azúcares reductores, compuestos con grupo amino, compuestos con grupo carbonilo ni saponinas. Nuestro estudio encontró fenoles y flavonoides, constituyentes químicos a los cuales se les atribuye la actividad antioxidante en ambos extractos; los cuales no difieren de lo esperado.

La diferencia de concentración entre los metabolitos secundarios evidenciados por el tamizaje fitoquímico del extracto crudo y etanólico de *Curcuma longa* L. se deben a la solubilidad de ellos en el solvente empleado en la extracción (etanol).

Tabla 11. Resultados de Tamizaje fitoquímico del extracto crudo y etanólico de *Curcuma longa* L.

Nº	Reactivo	Extracto etanólico	Extracto crudo	Constituyentes químicos
1	Molish	+++	+	carbohidratos
2	Antrona	-	-	carbohidratos
3	Felhing	-	-	Azucares reductores
4	FeCl ₃	+++	++	Compuestos fenólicos
5	Gelatina	+	+	Taninos
6	Shinoda	++	++	Flavonoides
7	Rosenheim	-	-	Catequinas
8	Borntrager	+	+	Compuestos antraquinónicos
9	Lieberman-Burchardat	++	+	Compuestos triterpenoides
10	Ninhidrina	-	-	Compuestos amino
11	Dragendorff	+++	++	Alcaloides
12	Mayer	-	-	Alcaloides
13	Bertrand	-	-	Alcaloides
14	Sonnenschein	-	-	Alcaloides
15	Hidroxilamina	-	-	Compuestos carbonilos
16	Prueba de espuma	-	-	Saponinas
17	Vainillin sulfúrico	+++	++	Heterósidos

Leyenda: + Presencia escasa; ++ Presencia moderada; +++ Presencia abundante; - No detectado.

4.1.3 Cuantificación de polifenoles totales presentes en el extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.

Se graficó los valores de absorbancia en función de la concentración de las soluciones, generando la curva patrón para los cálculos del ensayo de Folin-Ciocalteu correspondiente al ácido gálico con $R^2 = 0,9953$. La cantidad de compuestos fenólicos en cada extracto se determinó en μg de contenido fenólico equivalentes de ácido gálico/mg de extracto, utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración del ácido gálico. El contenido de polifenoles totales de la muestra de *Curcuma longa* L. corresponde a $252,05 \pm 0,005$ y $296,43 \pm 0.004$ μg equivalentes de ácido gálico/g de extracto crudo y etanólico respectivamente (Fig. 1).

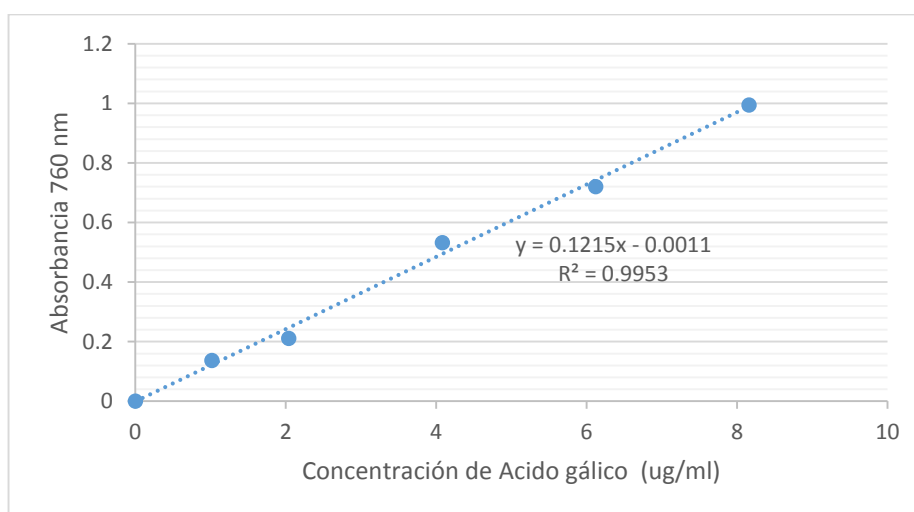


Figura 1. Curva de calibración del ácido gálico.

4.1.4 Efecto antioxidante in vitro del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.

En la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de *Curcuma longa* L., mediante la técnica de DPPH y ABTS, la caída en la absorbancia es un indicador del % de capacidad antioxidante sobre los radicales DPPH \cdot y ABTS $^{+}$.

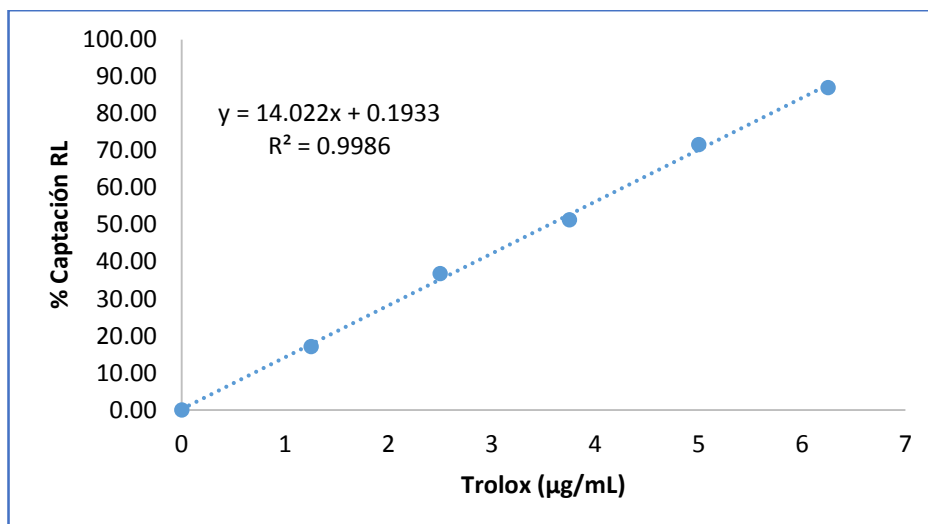


Figura 2. Curva de calibración del TROLOX en el método de DPPH
TROLOX (±)-6-Hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid. *Fuente.*

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/238813?lang=es®ion=CL>

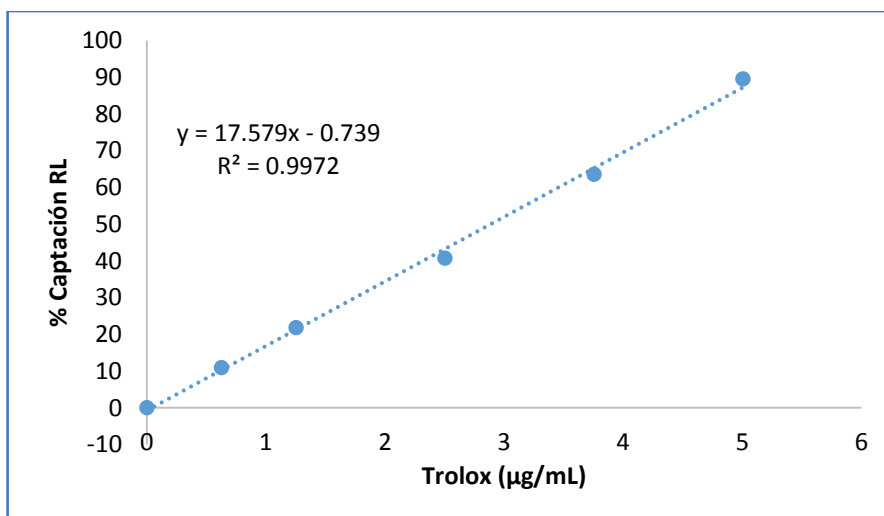


Figura 3. Curva de calibración del Trolox en el método de ABTS.

En las siguientes figuras se presentan el porcentaje de captación de radicales libres a diferentes concentraciones para los ensayos DPPH (figura 4) y ABTS (figura 5) para determinar el IC₅₀.

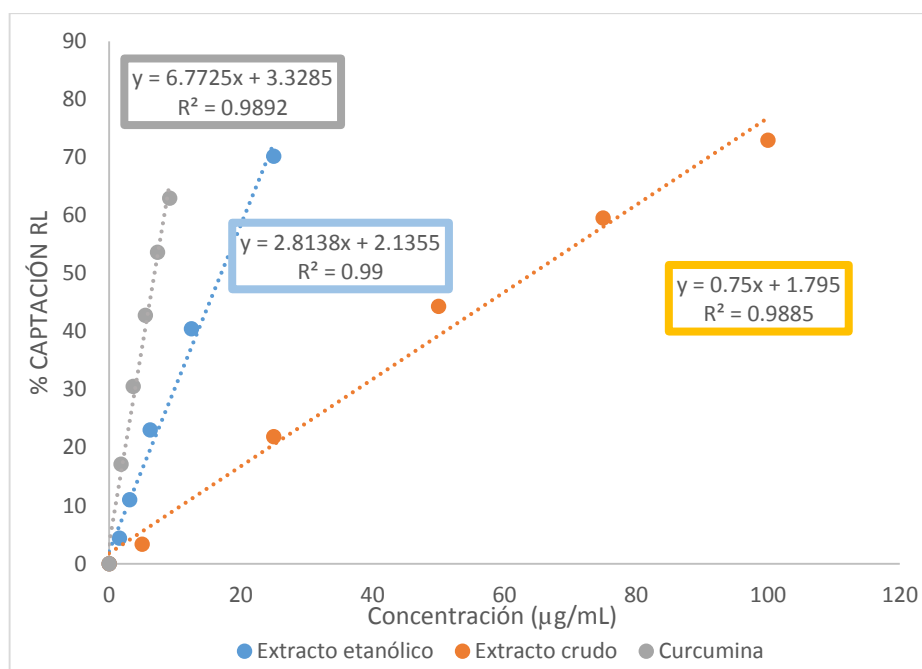


Figura 4. Extracto crudo y etanólico de *Curcuma longa* L., y curcumina frente al radical libre estable de DPPH para determinar el IC₅₀.

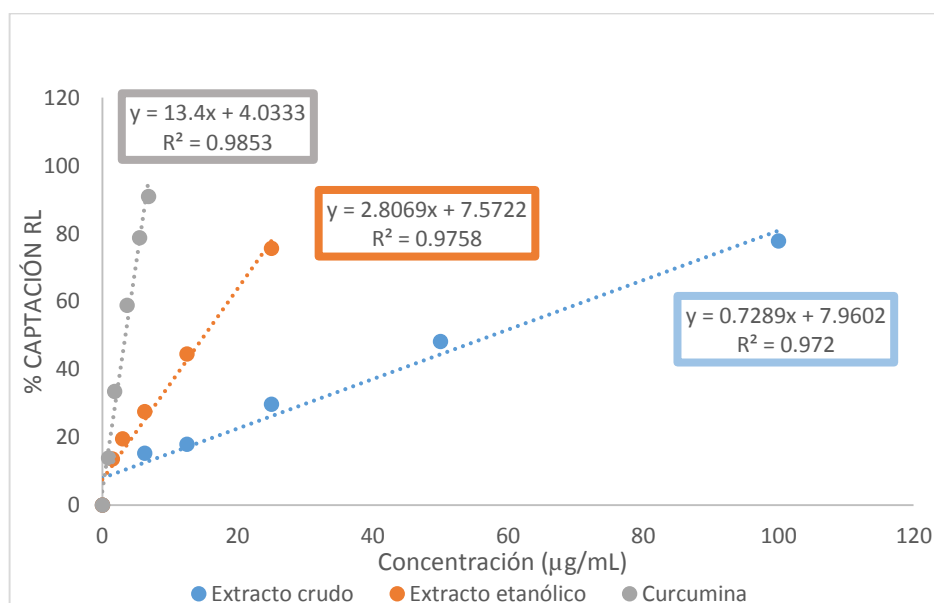


Figura 5. Extracto crudo, etanólico de *Curcuma longa* L., y curcumina frente al radical libre ABTS⁺ para determinar el IC₅₀.

Los resultados revelaron que el extracto etanólico tiene mayor capacidad antioxidante expresada por el más bajo IC₅₀ (17,01 µg ± 0,004 µg/mL) (Tabla 12) en comparación con el del extracto crudo IC₅₀ (64,26 ± 0,002 µg/mL); mediante el ensayo ABTS se mantuvo la

misma relación, el extracto etanólico presento nuevamente mayor capacidad antioxidante expresada por el más bajo IC_{50} ($15,12 \pm 0,003 \mu\text{g/mL}$) en relación al extracto crudo con un IC_{50} ($57,27 \pm 0,003 \mu\text{g/mL}$). Se observó una superior capacidad antioxidante con el método que se basa en el radical catiónico de ABTS+ para ambos extractos frente al radical DPPH. Las sustancias estándares curcumina y Trolox en la prueba con DPPH, tuvieron un IC_{50} de $6,89 \pm 0,004 \mu\text{g/mL}$ y $3,55 \pm 0,010 \mu\text{g/mL}$ respectivamente; en la prueba con ABTS el IC_{50} fue de $3,27 \pm 0,002$ y $2,88 \pm 0,003 \mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Tabla 12. Promedios IC_{50} para DPPH y ABTS de extractos de *Curcuma longa* L., Curcumina y Trolox.

	DPPH $IC_{50} \pm DE$ ($\mu\text{g/mL}$)	ABTS $IC_{50} \pm DE$ ($\mu\text{g/mL}$)
Extracto etanólico	$17,01 \pm 0,004$	$15,12 \pm 0,003$
Extracto crudo	$64,26 \pm 0,002$	$57,67 \pm 0,003$
Curcumina	$6,89 \pm 0,004$	$3,43 \pm 0,002$
Trolox	$3,55 \pm 0,010$	$2,89 \pm 0,004$

La capacidad antioxidante total, expresada en TEAC-DPPH y TEAC-ABTS, de ambos extractos se presenta en la tabla 13.

Tabla 13. Promedios de la evaluación de la capacidad antioxidante de extractos crudo y etanólico de *Curcuma longa* L. y Curcumina.

	Capacidad Antioxidante Total $\pm DE$ ($\mu\text{g/mg}$)	Capacidad Antioxidante Total $\pm DE$ ($\mu\text{M/mg}$)
DPPH EXT etanólico	$202,8 \pm 1,54$ (1)	$811,4 \pm 6,16$ (1)
DPPH EXT crudo	$52,95 \pm 0,48$ (1)	$211,8 \pm 1,92$ (1)
DPPH curcumina	$538,6 \pm 1,43$ (1)	$2154 \pm 5,72$ (1)
ABTS EXT etanólico	$182,8 \pm 0,96$ (2)	$727,3 \pm 3,80$ (2)
ABTS EXT crudo	$47,80 \pm 0,45$ (2)	$189,9 \pm 1,58$ (2)
ABTS curcumina	$833,7 \pm 3,66$ (2)	$3317 \pm 13,97$ (2)

(1) TEAC-DPPH: Capacidad antioxidante equivalente a TROLOX; (2) TEAC-ABTS: Capacidad antioxidante equivalente a TROLOX

Los resultados de los coeficientes de correlación (anexo 2-5) de la capacidad antioxidante con las dos técnicas aplicadas frente al contenido de metabolitos secundarios fenólicos muestran un valor de R² cercano a la unidad en ambos casos (tabla 14).

Tabla 14. Coeficiente de Correlación de Pearson (r) del extracto etanólico y crudo de *Curcuma longa* L.

	Fenoles Totales extracto etanólico	Fenoles Totales extracto crudo
DPPH	0,995	0,993
ABTS	0,960	0,999

4.1.5 Evaluación de la capacidad genotóxica.

4.1.5.1 Extracto crudo de *Curcuma longa* L. En la figura 6, se muestra el registro fotográfico del ensayo genotóxico in vitro del extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* “palillo” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular; los carriles de 2 al 7 son los del tratamiento al ADN genómico humano con las respectivas concentraciones del extracto crudo, se puede apreciar que en los carriles 2 y 3 cada banda del ADN no ha sufrido ninguna fragmentación por efecto del extracto crudo a concentración de 5 y 10 mg/mL, respectivamente, observándose igual que la banda del ADN genómico humano a 1,500 ng/μL “control” del carril 9, que no ha sido tratado con el extracto; el carril 4 muestra una banda de ADN ligeramente disminuida respecto a la del control, debido a la fragmentación que ha sufrido por efecto del extracto a 25 mg/mL, los carriles 5 y 6 muestran ADN con mayor fragmentación que la anterior, puesto que fue tratado con extracto a 50 y 100 mg/mL,

respectivamente; el carril 7 pone a la vista una banda de ADN fragmentado, se hace evidente si la comparamos con la banda del ADN “control” en el carril 9.

El carril 8, corresponde al corrido del “blanco”, es decir, el extracto crudo del rizoma de “curcuma” a 100 mg/mL; no se observó la presencia de ADN procedente del rizoma de “curcuma”. La banda que se observa en el carril 9, es el ADN genómico humano a 1,500 ng/μL sin ningún tratamiento, sirve como “control”, para comparar con el ADN de cada tratamiento a diferentes concentraciones del extracto crudo.

El carril 10, corresponde al corrido electroforético del tratamiento del ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, con 100 mg/mL de extracto crudo más la enzima proteinasa K, mostrando que la banda del ADN ha disminuido al igual que la del carril 6, comparando éstas con el “control”; reafirmando que la fragmentación del ADN, es por la acción de los metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo y no por las enzimas nucleasas que podrían proceder del mismo rizoma de la “curcuma”, ya que éstas estarían degradadas por acción de la proteinasa K, durante la incubación a 37°C durante una hora.

Los resultados visualizados en la figura 6 y tomando en cuenta la escala de la tabla 7, fueron llevados a valores numéricos designados al grado de fragmentación del ADN genómico humano, como producto de los ensayos genotóxico in vitro según la concentración del extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo”, los mismos que se reportan en tabla 15, detalla que con 5 y 10 mg/mL, respectivamente, la fragmentación fue menor al 5% del ADN; con 25 mg/mL, entre el 5 al 20%; con 50 mg/mL y 100 mg/mL, la fragmentación estuvo entre 40% al 95% del ADN; mientras que a concentración de 200 mg/mL, las fragmentaciones son mayores al 95% del ADN genómico humano.

Tomando estos datos, se pudo realizar el análisis estadístico con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de fragmentación del ADN genómico humano a 1,500 ng/μL en tratamiento expresado en porcentaje (%) versus la concentración del extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. expresado en miligramos por mililitro (mg/mL), mostrados en el anexo 6. Los resultados reportan que el grado de fragmentación el ADN genómico humano tratado, depende de la concentración del extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* L.

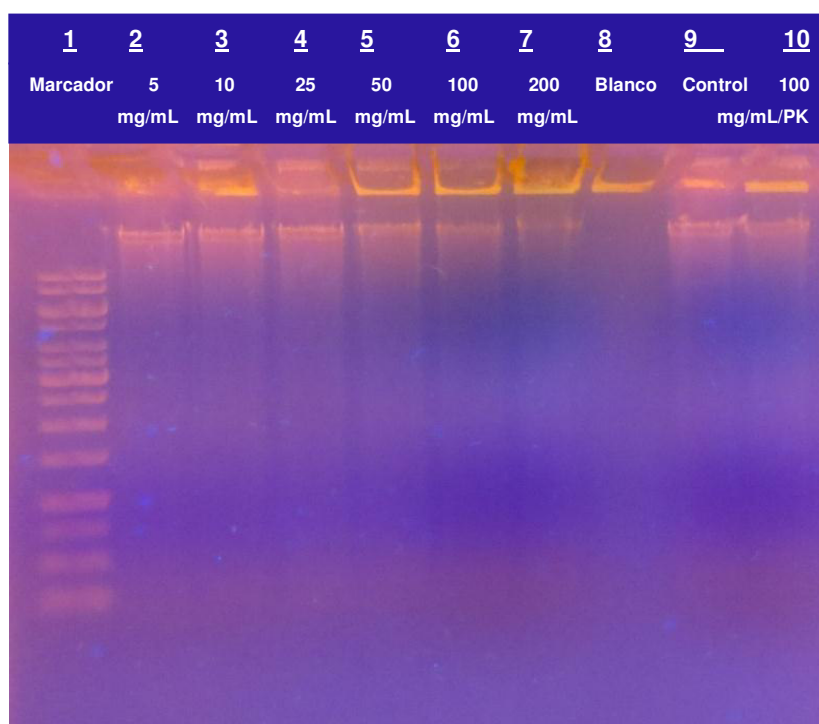


Figura 6. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora.

Leyenda: Carril N° 1: Marcador de tamaño molecular; carril N° 2: con 5 mg/mL; carril N° 3: con 10 mg/mL; carril N° 4: con 25 mg/mL; carril N° 5: con 50 mg/mL; carril N° 6: con 100 mg/mL; carril N° 7: con 200 mg/mL; carril N° 8: con 100 mg/mL de extracto (blanco); carril N° 9: con. 100% de ADN puro (control); carril N° 10: con 100 mg/mL de extracto + proteinasa K. Volumen de carga: Muestra (7 μL) + loading (1 μL) + agua PCR (2 μL) = 10 μL. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas. Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.

Tabla 15. Valores numéricos del ensayo genotóxico in vitro del extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora.

Condiciones de la incubación		<i>Curcuma longa</i> L.					
Temperatura °C	Tiempo Hora	Extracto crudo de rizoma					
		Concentración en mg/mL.					
		5	10	25	50	100	200
37	1	0	0	1	3	3	4
		0	0	1	3	3	4
		0	0	1	3	3	4
		0	0	1	3	3	4

* Los valores numéricos van del cero (0) al cuatro (4)

4.1.5.2 Extracto etanólico de *Curcuma longa* L. En la figura 7, se muestra el registro fotográfico del ensayo genotóxico in vitro del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo” a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL de concentración, incubado en baño María a 37°C durante una hora. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular; los carriles de 2 al 7 son los del tratamiento al ADN con las respectivas concentraciones del extracto etanólico, se puede apreciar que, en todos estos carriles, las bandas del ADN son similares entre ellas, así como con la banda de ADN “control” del carril 9; lo que demuestra que no hubo fragmentación de ADN, con ninguna de las concentraciones del extracto etanólico con la que fue tratada.

El carril 8, corresponde al corrido del “blanco”, es decir, el extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* “palillo” a 100 mg/mL; no se observa la presencia de bandas de ADN, que pudieran provenir del mismo rizoma. El carril 10, corresponde al corrido electroforético del tratamiento del ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, con 100 mg/mL de extracto etanólico de *Curcuma longa* L., más la enzima proteinasa K, mostrando banda de ADN igual que la del “control” (carril 9) y la de 100

mg/mL (carril 6), revelando que el ADN no ha sido fragmentado por acción de los metabolitos secundarios, tampoco por las nucleasas, porque éstas últimas fueron digeridas por la proteinasa K.

La banda que se observa en el carril 9, es el ADN genómico humano sin ningún tratamiento, sirve como “control”, para comparar con el ADN de cada tratamiento a diferentes concentraciones del extracto etanólico.

Los resultados visualizados en la figura 7 y tomando en cuenta la escala de la tabla 7, fueron llevados a valores numéricos designados al grado de fragmentación del ADN genómico humano, como producto de los ensayos genotóxico *in vitro* según la concentración del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. “palillo”, que se reporta en tabla 16, detalla que, con todas las concentraciones tratadas, la fragmentación fue menor del 5% del ADN.

Por tanto, tomando estos datos, para realizar el análisis estadístico con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de fragmentación del ADN genómico humano en tratamiento expresado en porcentaje (%) versus la concentración del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. expresado en miligramos por mililitro (mg/mL), mostrados en el anexo 7; solo se puede indicar que no hubo efecto genotóxico.

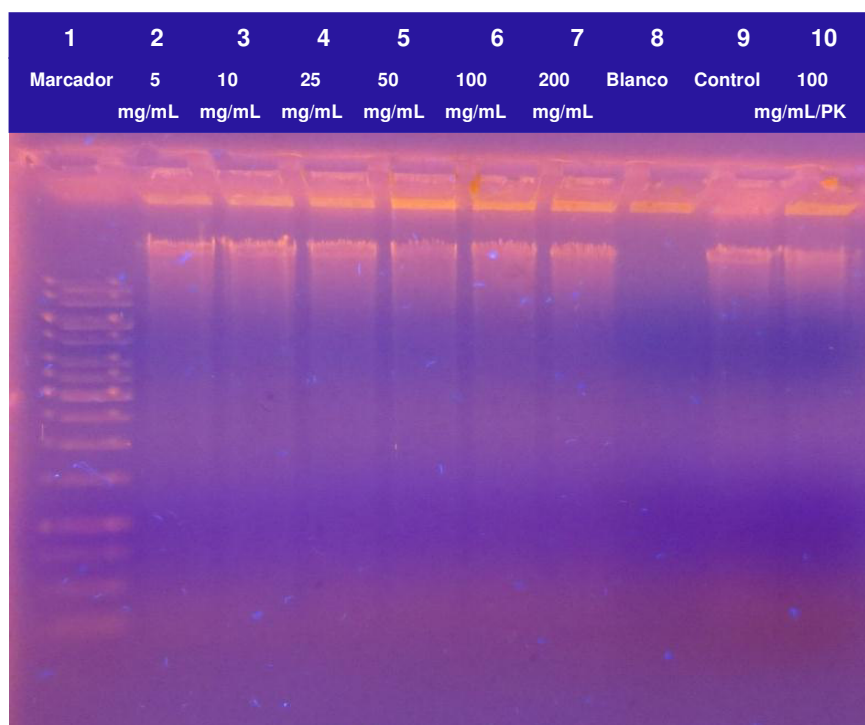


Figura 7. Ensayo genotóxico *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora.

Leyenda: Carril N° 1: Marcador de tamaño molecular; carril N° 2: con 5 mg/mL; carril N° 3: con 10 mg/mL; carril N° 4: con 25 mg/mL; carril N° 5: con 50 mg/mL; carril N° 6: con 100 mg/mL; carril N° 7: con 200 mg/mL; carril N° 8: con 100 mg/mL de extracto (blanco); carril N° 9: con. 100% de ADN puro (control); carril N° 10: con 100 mg/mL de extracto + proteinasa K. Volumen de carga: Muestra (7 μL) + loading (1 μL) + agua PCR (2 μL) = 10 μL. Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas. Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.

Tabla 16. Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora.

condiciones de la incubación		<i>Curcuma longa</i> L.					
Temperatura °C	Tiempo Hora	Extracto etanólico de rizoma.					
		Concentración en mg/mL.					
		5	10	25	50	100	200
37	1	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0

* Los valores numéricos van del cero (0) al cuatro (4)

4.1.5.3 Estandar Curcumina. En la figura 8, se muestra el registro fotográfico del ensayo genotóxico *in vitro* del estándar curcumina a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/ μ L de concentración, incubado en baño María a 37°C durante una hora. El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular; los carriles de 2 al 7 son los del tratamiento al ADN con las respectivas concentraciones del estándar curcumina, se observó que en los carriles 2 al 6, las bandas del ADN todas fueron similares entre ellas; sin embargo en la banda de ADN del carril 7, si mostró una disminución en el tamaño de la banda, comparando con la del “control”, señalando que la curcumina a ésta concentración si ha generado fragmentación del ADN.

El carril 8, corresponde al corrido del “blanco”, es decir, estándar curcumina a 100 mg/mL; no se observó la presencia de banda de ADN. La banda que se observó en el carril 9, fue el ADN genómico humano sin ningún tratamiento, sirvió como “control” de comparación. El carril 10, correspondió al corrido electroforético del tratamiento del ADN genómico humano a 1,500 ng/ μ L, con 100 mg/mL de estándar curcumina, más la enzima proteinasa K, evidenció que el ADN no fue degradado, siendo similar al “control”.

Los resultados visualizados en la figura 8 y tomando en cuenta la escala de la tabla 7, fueron llevados a valores numéricos designados al grado de fragmentación del ADN genómico humano, como producto de los ensayos genotóxico *in vitro* según la concentración del estándar curcumina, que se reportan en tabla 17, detalla que con 5, 10, 15, 50 y 100 mg/mL, respectivamente, la fragmentación fue menor al 5% del ADN; mientras que con 200 mg/mL, fue fragmentado entre el 5% al 20% del ADN genómico humano.

Tomando estos datos, se pudo realizar el análisis estadístico con la prueba de Kruskal – Wallis, confrontando el grado de fragmentación del ADN en tratamiento expresado en porcentaje (%) versus la concentración del estándar curcumina expresado en miligramos por mililitro (mg/mL), mostrados en el anexo 8. Los resultados reportan que el grado de fragmentación del ADN genómico humano se presenta con la máxima concentración 200 $\mu\text{g/mL}$ del estándar curcumina.

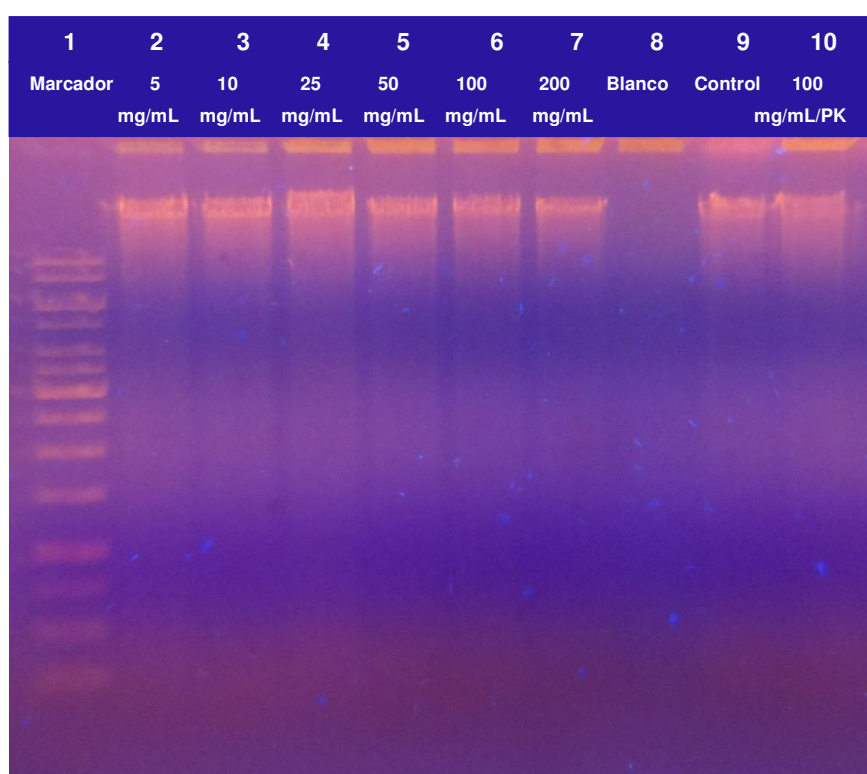


Figura 8. Ensayo genotóxico *in vitro* del estándar Curcumina a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/ μL , incubado a 37°C durante una hora.

Leyenda: Carril N° 1: Marcador de tamaño molecular; carril N° 2: con 5 mg/mL; carril N° 3: con 10 mg/mL; carril N° 4: con 25 mg/mL; carril N° 5: con 50 mg/mL; carril N° 6: con 100 mg/mL; carril N° 7: con 200 mg/mL; carril N° 8: con 100 mg/mL de extracto (blanco); carril N° 9: con. 100% de ADN puro (control); carril N° 10: con 100 mg/mL de extracto + proteinasa K. Volumen de carga: Muestra (7 μL) + loading (1 μL) + agua PCR (2 μL) = 10 μL . Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas. Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 15 minutos.

Tabla 17. Valores numéricos del ensayo genotóxico in vitro del estándar Curcumina a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/mL, frente a ADN genómico humano a 1,500 ng/μL, incubado a 37°C durante una hora.

Condiciones de la incubación		Estándar					
Temperatura °C	Tiempo Hora	Curcumina					
		Concentración en mg/mL.					
		5	10	25	50	100	200
37	1	0	0	0	0	0	1
		0	0	0	0	0	1
		0	0	0	0	0	1
		0	0	0	0	0	1

* Los valores numéricos van del cero (0) al cuatro (4)

4.1.6 Evaluación de la capacidad antitumoral.

Con el propósito de evaluar si los extractos crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. afectan el potencial proliferativo de células tumorales HT-29, DU-145; fueron estimulados con diferentes concentraciones. La concentración requerida para reducir en un 50 % el número celular (IG₅₀) fue calculada.

4.1.6.1 Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. y Curcumina sobre la línea celular tumoral DU-145 (adenocarcinoma de próstata). En la Fig. 9, a una concentración de 62,5 μg/mL de ambos extractos del rizoma de *Curcuma longa* L; el extracto etanólico se asoció con una mayor mortalidad de la línea celular tumoral DU-145, dependiente de la dosis, al provocar la reducción significativa del número de células supervivientes al 11%, mientras que el extracto crudo llegó a un 56 %, después del tratamiento. En comparación con los controles, el 5-FU a una concentración de 1,95 μg/mL, disminuyó al 50 % el número de células supervivientes.

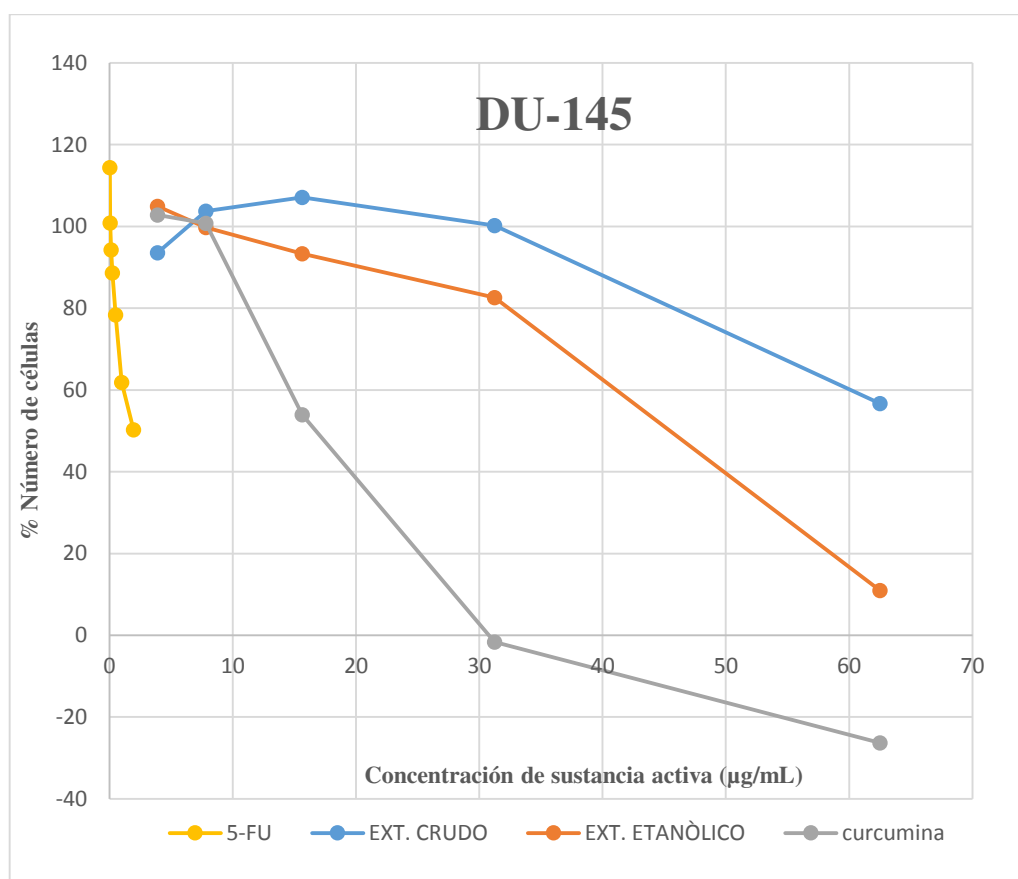


Figura 9. Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., y Curcumina sobre la línea celular tumoral DU-145.

4.1.6.2 Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. y Curcumina sobre la línea celular tumoral HT-29 (carcinoma de colón). En la Fig. 10, el extracto etanólico y crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. indujeron una respuesta citotóxica dependiente de la dosis al reducir significativamente el número de células supervivientes de la línea celular tumoral HT-29 al 0 y 12% respectivamente, después del tratamiento, a una concentración de 62,5 µg/mL. En comparación con los controles, el 5-FU a una concentración de 1,95 µg/mL disminuyó al 33 % el número de células supervivientes.

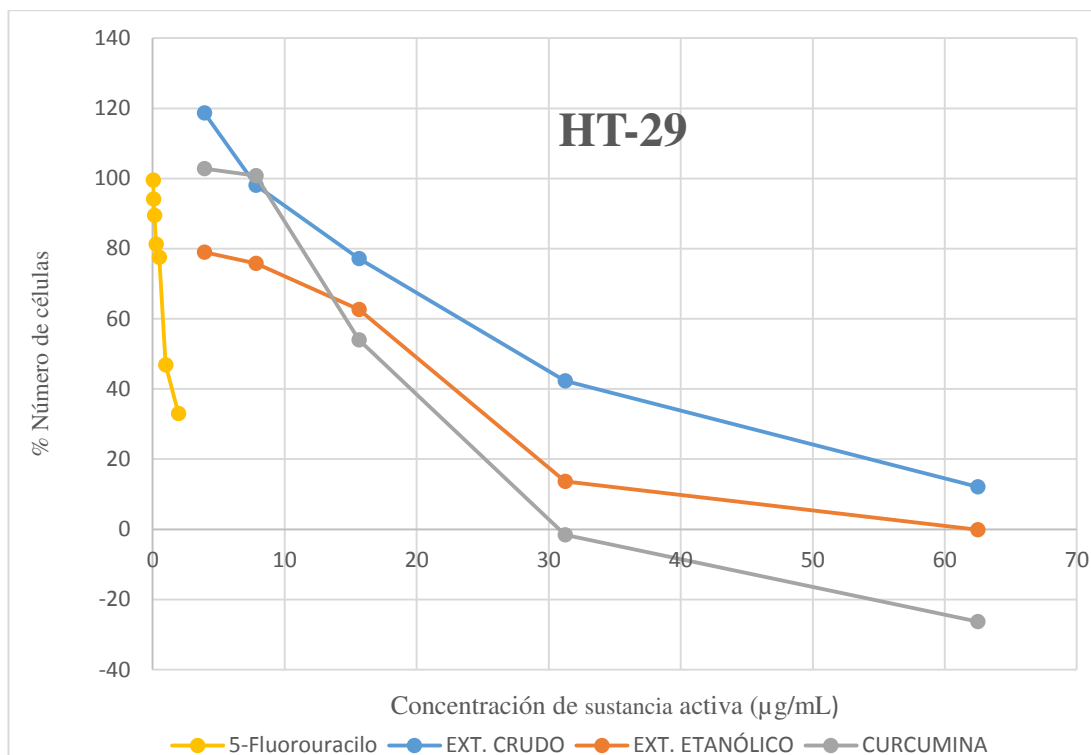


Figura 10. Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., y Curcumina sobre la línea celular tumoral HT-29.

4.1.6.3 Actividad antitumoral de los extractos crudo, etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. y Curcumina sobre la línea celular normal de ratón 3T3. En la Fig. 11, el extracto etanólico y crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. indujeron una respuesta citotóxica, dependiente de la dosis, al reducir el número de células supervivientes al 0 y 35% respectivamente, después del tratamiento, a una concentración de 62,5 µg/mL. En comparación con los controles, el 5-FU disminuyó al 33 % el número de células supervivientes de la línea celular normal de ratón 3T3 a una concentración de 1,95 µg/mL.

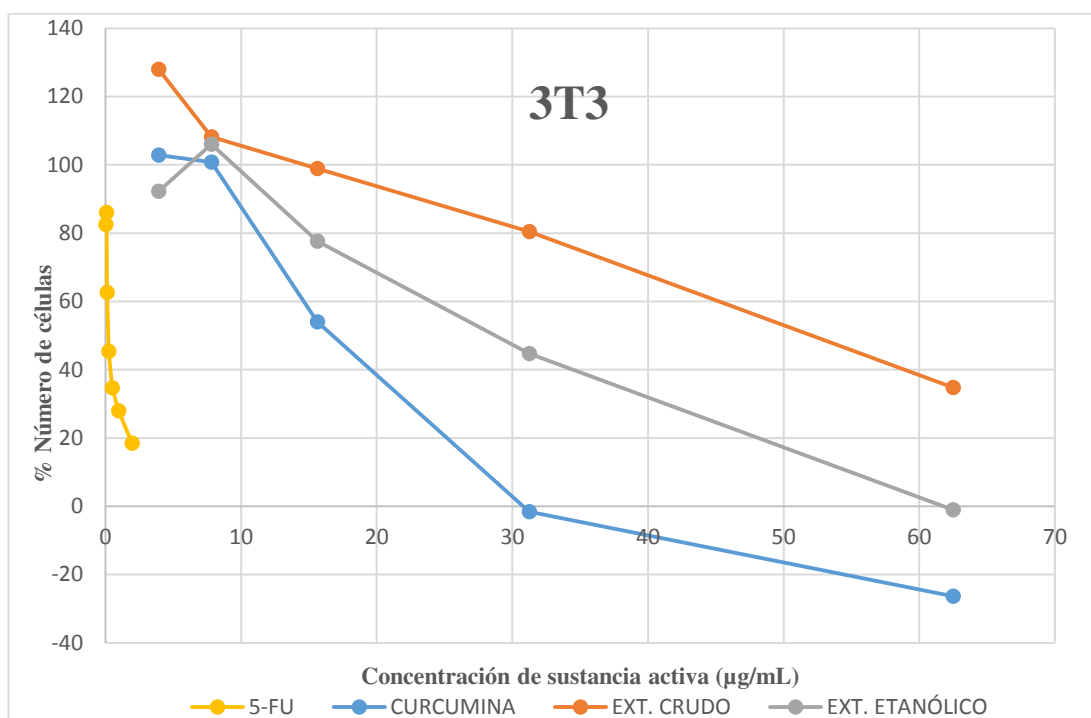


Figura 11. Actividad citotóxica de los extractos crudo, etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., y Curcumina sobre la línea celular normal de ratón 3T3.

4.1.6.4 Determinación de la IG_{50} . La IG_{50} , concentraciones que producen un 50% de Inhibición crecimiento, fue determinada con los datos obtenidos en el lector ELISA (Bio-Rad modelo 450). Los datos fueron convertidos en porcentaje de supervivencia celular correlacionados con las concentraciones del extracto crudo y etanólico de *Curcuma longa* L. y Curcumina (tabla 18). Se utilizó un modelo de regresión lineal calculando la ecuación de la recta en cada ensayo. Se realizó una interpolación para calcular la disminución del 50 % de la población celular (IG_{50}).

Tabla 18. Valores de IG_{50} y citotoxicidad del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., Curcumina y 5- Fluoro-Uracilo en célula tumoral y normal.

Sustancias Citotóxicas	Valores de IG_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	Célula tumoral humana DU-145	Célula tumoral humana HT-29	Célula normal de ratón 3T3
Extracto etanólico	20,54 \pm 2,588	13,24 \pm 0,766	14,39 \pm 1,106
Extracto crudo	81,89 \pm 46,89	12,98 \pm 0,206	64,85 \pm 6,03
Curcumina	13,94 \pm 2,789	3,96 \pm 0,602	7,650 \pm 0,686
Control 5-FU	2,64	1,93	0,77

De los resultados presentados en la tabla 18, podemos observar que el extracto etanólico presenta mejor actividad antitumoral para ambas líneas celulares DU-145 y HT-29, asimismo la actividad antiproliferación del extracto etanólico es muy cercana al estándar de curcumina para la línea celular HT-29.

4.2 DISCUSIÓN

Los estudios en el rizoma de *Curcuma longa* L en nuestro país son escasos y más aún sobre capacidad citotóxica en líneas celulares tumorales y su actividad genotóxica. En esta investigación se ha identificado los principales compuestos bioactivos presentes en los extractos crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., su capacidad antioxidante, antitumoral y genotóxica se determinó en ambos extractos del rizoma. Aporte potencialmente promisorio por sus altos valores de capacidad antioxidante para ser usado en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica.

Estudios fitoquímicos realizados en el rizoma de *Curcuma longa* L. reportan compuestos fenólicos, siendo el más importante curcumina, reconocida por su capacidad atrapadora de radicales libres, antioxidante (Freire-González y Vistel-Vigo, 2015; Kadri y otros, 2018); en nuestro estudio fitoquímico del extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., se evidenció presencia de metabolitos: polifenoles, flavonoides,

compuestos triterpenoides, constituyentes químicos a los cuales se le atribuye la capacidad antioxidante, semejantes a las investigaciones realizadas por Freire y Vistel-Vigo. (2015) y Abdel-Lateef y otros (2016); quienes encontraron abundantes compuestos fenólicos; regular cantidad de flavonoides; y poca cantidad de quinonas y taninos. Asimismo, el perfil fitoquímico del extracto etanólico evaluado es consistente con los reportes bibliográficos de Rajesh y otros (2013), Chairman, Jayamala, Christy y Singh (2015) y Villalta & García (2017); destacando la presencia de alcaloides, flavonoides y taninos.

Respecto a los compuestos fenólicos, en cada extracto se determinó el contenido fenólico en equivalentes de ácido gálico/mg de extracto seco. El contenido de polifenoles totales de la muestra de *Curcuma longa* L., corresponde a $296,43 \pm 0,004$ y $252,05 \pm 0,005$ mg equivalente ácido gálico/mg de extracto seco etanólico y crudo respectivamente por lo cual el etanol al 96° representaría un mejor solvente para extraer polifenoles como lo corrobora los datos encontrados y tamizaje fitoquímico. Los resultados son similares a Lekshmi, Arimboor, Nisha, Nirmala & Raghu (2014), quienes reportan un valor de $297,5 \pm 24,4$ mg GAE/g de extracto seco; y Akter, Hossian, Takara, Islam & Hou (2018) indican un valor de $157,4 \pm 1,0$ mg GAE/g extracto seco. Ambas investigaciones utilizaron como solvente de extracción, metanol.

Akinola, Ahmad y Maziah (2014), determinaron polifenoles totales a especies de *Curcuma* en extracto metanólico, destacando la especie *Curcuma longa*, al presentar el mejor contenido de polifenoles, 39,38mg/GAE/g extracto seco seguido de la especie *Curcuma xanthorrhiza* con un valor de 38,01mg/GAE/g extracto seco; asimismo, valores mucho más bajos en la especie *Curcuma aeroginosa* con valores de 6,41mg/GAE/g extracto seco.

Investigaciones realizadas donde utilizan como solvente etanol para realizar la extracción, presentan valores muy bajos en relación con nuestros resultados, Margina y otros (2015) encuentran un valor de $38,326 \pm 0,9992$ (μg GAE/mg extracto) para el extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.; Tanvir y otros (2017) muestran valores de

29,64 GAE/100 g de muestra seca. En nuestro estudio encontramos valores de 296,43 mg/GAE/mg extracto seco, que nos indicaría una mejor calidad de la *Curcuma longa* L. debido a las consideraciones de suelos con mayor cantidad de nutrientes y constituyentes polifenólicos.

Correa (2015) reporta 53,95 mg/GAE/mg extracto seco, en cuantificación de fenoles existentes en extracto acuoso de *Curcuma longa* L. de Ecuador, mientras nuestros resultados difieren en un mayor valor: $252,05 \pm 0,005$ mg/GAE/mg extracto seco, se debería al tipo de extracción realizado.

La capacidad antioxidante in vitro, de captar radicales DPPH \cdot en el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. fue elevada, IC₅₀ de 17,01 μ g/mL (Tabla 12). Si comparamos este valor con la IC₅₀ de Trolox (3,54 μ g/mL) y Curcumina (6,89 μ g/mL) se puede considerar de alta actividad antioxidante, teniendo en cuenta que las sustancias de referencia (Trolox y Curcumina) son compuestos puros. El extracto crudo presenta una IC₅₀ de 64,27 μ g/mL. Ambos extractos, son una mezcla de metabolitos secundarios con actividad antioxidante; el etanol al 96° representaría un óptimo solvente para extraer polifenoles antioxidantes como lo evidencia su comportamiento frente al radical DPPH \cdot . La existencia de mayor cantidad de compuestos fenólicos en el extracto etanólico, un valor de $296,43 \pm 0,004$ μ g GAE/g, explicaría su mayor capacidad antioxidante, en comparación al extracto crudo con un valor de $252,05 \pm 0,005$ μ g GAE/g.

En investigaciones realizadas por Lekshmi, Arimboor, Nisha, Nirmala & Raghu (2014) sobre capacidad de captación de radicales en extractos de rizoma de *Curcuma* en metanol por el método DPPH reportan valores de IC₅₀ $53,7 \pm 0,82$ (μ g/mL); y para la estándar curcumina IC₅₀ (μ g/mL) $6,90 \pm 0,43$. Priya, Sangilimuthu, karpagavalli, Ramkumar & Josphin (2017) reportan un IC₅₀ DPPH $415,55 \pm 1,45$ μ g/mL para un extracto con metanol al 80%; Serairi y otros (2018) presenta un IC₅₀ DPPH $35,75 \pm 0,52$ μ g/mL para un extracto con metanol al 80%. De igual modo, Akter, Hossain, Takara, Islam & Hou (2018) presentan la

investigación de diferentes especies y variedades de *Curcuma*, para *C. longa* (variety Ryudai gold) muestran un IC_{50} DPPH de $26,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ y para *C. longa* (variety desconocida de Okinawa un valor de $291,3 \pm 3,1$; para otras especies, los IC_{50} DPPH son *C. Xanthorrhiza* $80,4 \pm 0,7$; *C. aromática* $130,7 \pm 2,0$; *C. amada* $92,8 \pm 3,4$; y *C. cedoaria* $228,4 \pm 3,4 \mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Asimismo, estudios de IC_{50} frente al radical libre DPPH, reportados en la literatura con solvente de etanol, como el de Nahak & Kanta (2011), donde sus resultados revelan que la fracción etanólica del rizoma *C. longa* exhibía la mayor actividad de eliminación de radicales con $24 \mu\text{g/mL}$ seguido *C.zedoaria* ($40 \mu\text{g/mL}$); *C.angusifolia* ($100 \mu\text{g/mL}$) y *C. aromático* ($140 \mu\text{g/mL}$) respectivamente; y Kadri y otros (2018) quien reporta un IC_{50} DPPH $76 \mu\text{g/mL}$ para un extracto con etanol al 70 %;

Comparados todos estos estudios con nuestros resultados en *Curcuma longa* L., podemos afirmar que los metabolitos secundarios de este rizoma del valle de Chanchamayo (Junin), Provincia de Tarma, tienen una mayor capacidad antioxidante que los anteriormente mencionados, frente al radical DPPH por nuestros valores reportados, IC_{50} $17,07 (\mu\text{g/mL}) \pm 0,004$ para el extracto con etanol y IC_{50} $6,89 (\mu\text{g/mL}) \pm 0,002$ para estándar Curcumina.

Respecto a la capacidad antioxidante del rizoma de *Curcuma longa* L., utilizando el método DPPH para el ensayo de eliminación de radicales libres expresado como equivalente de Trolox en extracción con etanol, reportamos un valor de $202,86 \mu\text{g/mg}$ de muestra, este valor se encuentra muy cercano a los datos reportados por Akinola, Ahmad & Maziah (2014) en extracciones con metanol de $266,95 \text{ mg/g}$ de muestra, equivalentes de Trolox.

Correa, Rodriguez, Marcowicz and Villavicencio (2018), al utilizar una mezcla de solventes acetona/metanol (70:30, v/v) para obtener un extracto de *Curcuma longa* L., reportaron un IC_{50} de $10,8 \pm 0,7$ en la determinación de actividad antioxidante por DPPH en mg/g de extracto seco. Investigaciones en la región asiática realizadas por Tanvir y otros

(2017), reportan valores de IC_{50} por el método DPPH de extractos en etanol de *Curcuma longa* L. en dos variedades diferentes (“mura” y “chora”) del distrito de Khulna y el distrito de Khagrachari de Chittagong en República Popular de Bangladesh, 3,03 y 1,19 $\mu\text{g/mL}$; por último, Canelo-Saldaña y col. (2017) al trabajar sobre un extracto acuoso liofilizado de *Curcuma longa* L. destaca un IC_{50} : 11,03 mg/mL . Estos estudios presentan mayor capacidad antioxidante que la nuestra.

El estudio *in vitro* de la capacidad antioxidante realizada por el método ABTS del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. presenta mayor capacidad antioxidante expresada por el más bajo IC_{50} ($15,12 \pm 0,003 \mu\text{g/mL}$) (Tabla 12), valor de alta actividad antioxidante si lo comparamos con la IC_{50} Trolox (2,89 $\mu\text{g/mL}$) y Curcumina (3,43 $\mu\text{g/mL}$). El extracto crudo presenta una IC_{50} de 57,67 $\mu\text{g/mL}$.

El resultado en esta investigación, 192,17 μmol equivalente a Trolox/g muestra seca, representa mayor capacidad antioxidante por ABTS que el evaluado por Tiveron y otros (2012), valor de $118,6 \pm 3,77 \mu\text{mol}$ equivalente a Trolox/g muestra seca.

Devaraj et al. (2014) determinaron actividad antioxidante mediante el método ABTS para un extracto etanólico de *Curcuma xanthorrhiza* (CX), IC_{50} $0,005 \pm 0,001$ y $0,928 \pm 0,314 \text{ mg/mL}$ para la fracción de hexano y acuosa respectivamente, el valor encontrado en esta investigación para *Curcuma longa* L. es mayor.

Yasmen, Ismail, Ramanathan & Yam (2017) utilizando el método de sonicación para la obtención del extracto etanólico, presentó un porcentaje de actividad antioxidante de $84,7 \pm 0,8$ utilizando el método de ensayo ABTS a una concentración de 100 μg de extracto/mL; el valor en esta investigación fue de 77,79 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto crudo a la misma concentración.

Se observó mejor capacidad antioxidante con el método ABTS para ambos extractos, frente al radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Se puede inferir que los constituyentes químicos que le dan capacidad

antioxidante son de naturaleza lipofílica e hidrofílica (Berker, Demirata & Apak, 2012).

El ensayo de genotoxicidad demostró que el extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. es genotóxico dependiente de la concentración, desde una concentración muy baja (25 mg/mL). El extracto etanólico no presentó genotoxicidad y el estándar curcumina presentó capacidad genotóxica a la concentración máxima estudiada, 200 mg/mL.

Estudios realizados en plantas medicinales de otras familias, refieren que el efecto genotóxico se atribuye a metabolitos secundarios principalmente azúcares reductores y taninos. Presentan efecto sinérgico los metabolitos, mostrando actividad alelopática, causando daños en particular a la célula y al ADN y conduciendo a la muerte celular (Sumitha & Thoppil, 2016; Dos Santos et al., 2018).

Respecto a estudios sobre efecto antitumoral reportados en la literatura realizada con rizoma de *Curcuma longa* L. son escasos. En este estudio, fueron evaluados usando el ensayo SBS en los extractos crudo y etanólico de *Curcuma longa* L. su potencial anticancerígeno en líneas celulares cultivadas in vitro, células de cáncer de próstata DU-145 y colon humano HT-29 en comparación con células de control normales de ratón 3T3, a través de mediciones de supervivencia celular. Se consideró a la curcumina como estándar y se utilizó como control positivo el antineoplásico 5-Fluoro-Uracilo. El tratamiento consideró concentraciones de 3,9 a 62,50 µg/mL para los extractos de *Curcuma longa* L.; la exposición de las células a concentraciones crecientes de extractos etanólico, crudo y Curcumina durante 48 h inhibió el crecimiento de la línea celular de carcinoma de colon HT-29 y la línea celular de carcinoma de próstata DU-145. No encontramos una verdadera correlación lineal entre las concentraciones de los extractos, curcumina y el porcentaje de crecimiento celular; utilizamos 4 puntos correspondientes a las concentraciones más cercanas al IG₅₀ para la construcción de una recta y determinar una IG₅₀; este artificio es válido solo cuando se trabaja con extractos, debido a que contiene un gamma

de compuestos químicos diferentes (Quispe et al., 2007; León et al., 2016).

Los resultados demuestran que el extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. tiene efecto citotóxico y potencial actividad antitumoral contra las células HT-29 y DU-145, al presentar disminución en la supervivencia celular al incrementarse las concentraciones de los extractos de *Curcuma longa* L. y Curcumina.

La sensibilidad citotóxica de los extractos de *Curcuma longa* L y Curcumina es diferenciada entre las células tratadas. Sin embargo, la mejor actividad fue exhibido por el extracto etanólico ~~que exhibió el~~ con el IG₅₀ más bajo en estudios de proliferación celular de las líneas celulares estudiadas.

Los extractos crudos y etanólico, con Curcumina inhibieron el crecimiento de las células HT-29 con mayor eficacia que la línea celular DU-145. La IG₅₀ expresada en µg/mL para la línea celular de cáncer de colon HT-29 es 13,22 para el extracto etanólico, 15,71 para el extracto crudo y resalta la actividad de la curcumina con un valor IG₅₀ 3,96. En el caso de células de cáncer de próstata DU-145, presentaron valores óptimos de IG₅₀ 20,54 µg/mL para el extracto etanólico en comparación del extracto crudo con un IG₅₀ 81,89 µg/mL, la Curcumina presenta un valor IG₅₀ 13,94 µg/mL. Finalmente, para la células de control normales de ratón 3T3, presentó valores de IG₅₀ 14,39 µg/mL para el extracto etanólico en comparación del extracto crudo con un IG₅₀ 64,85 µg/mL, la Curcumina presenta un valor IG₅₀ 7,65 µg/mL.

Cao y otros (2013) ha reportado estudios con curcumina que inhiben el crecimiento de las células HT-29 con un IC₅₀ 40,7 ± 0,5 mM, valor más alto que en nuestros resultados. Hong et al. (2006) expone que la curcumina inhibe la proliferación celular de la línea celular DU-145 de manera dependiente a la dosis.

Yue y otros (2016) encontró que el extracto etanólico de *C. longa* inhibió el crecimiento de las células de cáncer de colon en una dosis

dependiente del tiempo; asimismo, la IG_{50} del extracto estimó en 11,67 $\mu\text{g} / \text{mL}$ en la línea celular HT-29, muy cercano a nuestros resultados.

Estudios de Condori, Rojas, Gutiérrez y Pino-Figueroa (2015) al comparar el efecto de citotoxicidad *in vitro* sobre cultivos celulares MDA-MB 231 en presencia de la curcumina y curcumina dietil succinato concluyó que la curcumina produjo mayor reducción de la viabilidad, que la curcumina dietil succinato en todas las concentraciones empleadas; Calaf, Ponce-Cusi & Carrión (2018) señalan la capacidad de curcumina para inducir la apoptosis en células tumorales, y/o potenciar la inducción de la apoptosis por fármacos quimioterapéuticos clásicos como paclitaxel en líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231, apoyando su potencial en terapias anticancerígenas.

Kuete y otros (2013) mencionan que el programa de tamizaje de plantas del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos considera que tiene actividad citotóxica *in vitro* un extracto crudo, si el valor de IG_{50} después de la incubación entre 48 y 72 h es inferior a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este estudio, el extracto etanólico y crudo mostraron actividad citotóxica (Tabla 17) frente a la línea celular HT-29, ($IG_{50} = 13,24$ y $12,98 \mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente), sin llegar a superar al 5-Fluoro-uracilo y Curcumina (compuestos puros). A pesar de ello, para las línea control 3T3 y DU-145 por el extracto crudo, la citotoxicidad fue menor.

Bajo esta condición, se considera a la *Curcuma longa* L. como un producto potencialmente anticanceroso prometedor y se deben continuar su investigación para detectar su efectividad en otras líneas celulares de cáncer.

CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Curcuma longa* L. presentó mayor capacidad antioxidante *in vitro* respecto al extracto crudo, aplicándose las dos técnicas estandarizadas de DPPH y ABTS, y están en correlación directa con la cuantificación de polifenoles *in vitro*.
2. El extracto crudo de *Curcuma longa* L, presentó un efecto genotóxico dependiente de su concentración, frente al DNA genómico humano, mientras que el extracto etanólico no lo presentó y el estándar Curcumina lo presentó en la concentración de 200 mg/mL.
3. El efecto antiproliferativo frente a la línea celular de cáncer de próstata DU-145 *in vitro* es dosis dependiente y selectivo entre el extracto crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. (palillo).
4. Los extractos crudo y etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. presentaron efecto antiproliferativo frente línea celular de cáncer de colon HT-29 *in vitro* es dosis dependiente.

RECOMENDACIONES

- 1- Realizar estudios de investigación con el extracto crudo del rizoma de *Curcuma longa* L. que permitan separar y caracterizar la estructura química de los metabolitos secundarios relacionados con el efecto genotóxico.
- 2- Realizar estudios preclínicos *in vivo* del extracto etanólico el cual posee efecto antitumoral y no efecto genotóxico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Lateef, E., Mahmoud, F., Hammam, O., El-Ahwany, E., El-Wakil, E., Kandil, S.,.....Hassenein, H. (2016). Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa* L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2). *Acta Pharm.* 66: 387–398
- Ahumada, O., y Bardales, M. (2011). *Perfil enzimático antioxidante en habitantes de Nueva Cajamarca – San Martín*. (Tesis de pregrado) UNMSM, Lima, Perú.
- Akinola, A., Ahmad, S., y Maziah, M. (2014). Total Antioxidant Capacity, Total Phenolic Compounds and the Effects of Solvent Concentration on Flavonoid Content in *Curcuma longa* and *Curcuma xanthorrhiza* Rhizomes. *Medicinal & Aromatic Plants*, 03(02)
- Akter, J., Hossain, M., Takara, K., Islam, M., & Hou, D.-X. (2018). Antioxidant activity of different species and varieties of turmeric (*Curcuma* spp): Isolation of active compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 215:9–17.
- Alborghetti, G., Casanova, M., Oliveira, G., Fonseca, L., Salvador, N. y Gatti, P. (2015). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. *Rev Bras Anesthesiol*, 65(1):21-26
- Alvis, A., Arazola, G. y Martinez, W. (2012). Evaluación de la Actividad y el Potencial Antioxidante de Extractos Hidro-Alcohólicos de *Curcuma* (*Curcuma longa*). *Información Tecnológica Vol. 23* N° 2
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures (ACS) 2018. Recuperado <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>

- Anuja, K., Roy, S., Ghosh, Ch., Gupta, P., Bhattacharjee, S. & Banerjee, B. (2017). Prolonged inflammatory microenvironment is crucial for pro-neoplastic growth and genome instability: a detailed review. *Inflamm. Res.* 66:119–128
- Araki, D., Quispe, V., Pereira da Silva, V., Rangel, S., Estadella, D., de Barros, M. & Fujiyama C. (2017). Putative mechanisms of genotoxicity induced by fluoride: a comprehensive review. *Environ Sci Pollut Res.* 24:15254–15259
- Beltran, N. y Gonzáles, C. (2016). *Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos*. Santa Fe Cuajimalpa. México. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa.
- Berker, k., Demirata, B. & Apak, R. (2012). Determination of Total Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants in the Same Solution by Using Ferric–Ferricyanide Assay. *Food Anal. Methods* 5:1150–1158
- Bhattacharya S. (2015). Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. V. Rani and U.C.S. Yadav (eds.), *Free Radicals in Human Health and Disease*, 17 DOI 10.1007/978-81-322-2035-0_2, © Springer India.
- Botero, H. (2011). *Plantas medicinales; pasado y presente*. Medellin, Colombia. Recuperado de https://www.academia.edu/4177403/Plantas_medicinales
- Brand-Willlliams, W., Cuvelier, M. & Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol*; 28:25-30.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Cancer J Clin.* 68 (6): 394-424.
- Calaf, G., Ponce-Cusi, R. & Carrión, F. (2018). Curcumin and paclitaxel induce cell death in breast cancer cell lines. *ONCOLOGY REPORTS* 40: 2381-2388
- Canelo-Saldaña, P., Mendoza-Gardini, Y., Villacrés, J., Aranda-Ventura, J. y Gonzales-Aspajo, G. (2017). Análisis fitoquímico, actividad antioxidante y hepatoprotectora del extracto acuoso liofilizado de *Curcuma longa* en

- lesiones hepáticas inducidas con tetraclorometano en ratas albinas. *REV PERU MED INTEGRATIVA*; 2 (3):765-72
- Cao, A., Li, Q., Yin, P., Dong, Y., Shi, H., Wang, L., Xie, J. & Wu, D. (2013). Curcumin induces apoptosis in human gastric carcinoma AGS cells and colon carcinoma HT-29 cells through mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*, 18(11), 1391–1402.
- Carrillo, R., Díaz, J., Peña, C., Flores, O., Maldonado, M., Zepeda, A., Pérez, A. y Ortiz, A. (2016). Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. Vol. 59, N°1.
- Carvalho, L. (2014). *Efeito da curcumina na angiogênese em modelo experimental de câncer de mama*. (Tesis de maestría). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto – SP.
- Casado, I., Mora, N., Ferrer G., Fernández, S., y Pino, D. (2016). Citotoxicidad in vitro y potencialidades de los compuestos quinoides como agentes antitumorales. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(1):30-42.
- Chairman, k., Jayamala, M., Christy, V. y Singh, R. (2015). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Curcuma longa* Natural Dye. *General Med* 3: 171. doi:10.4172/2327-5146.1000171
- Chirino, Yolanda I, Orozco-Ibarra, Marisol, & Pedraza-Chaverri, José. (2006). Evidencias de la participación del peroxinitrito en diversas enfermedades. *Revista de investigación clínica*, 58(4), 350-358. Recuperado en 23 de junio de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762006000400010&lng=es&tlng=es.
- Churampi, D. (2016). *Evaluación de la acción antiproliferativa del extracto acuoso de Physalis peruviana L. (Aguaymanto) en cultivos celulares de linfocitos humanos y leucemia mieloide crónica (K562)*. (Tesis pregrado). UNMSM. Perú.
- Clapé, O. y Alfonso, A. (2011). Avances en la caracterización farmacotoxicológica de la planta medicinal *Curcuma longa* L. *MEDISAN*; 16(1):97

- Collins, A. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology. Volume 26*.
- Condori, R., Rojas, R., Gutiérrez, R. y Pino-Figueroa, A. (2015). Evaluación *in-vitro* del efecto de la curcumina y curcumina dietil succinato sobre la viabilidad y producción de il-6 en cultivos celulares de cáncer de mama. *Revista Con-ciencia N°1/Vol. 3*: 17-26
- Contreras, J. (2015). *Evaluación de la actividad antioxidante y el efecto citotóxico de los extractos etanólicos, etéreos y fracciones de las inflorescencias y hojas de achyrocline bogotensis (asteraceae)*. (Tesis de pregrado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Bogotá. Colombia.
- Coronado, M., Vega y León, S., Gutiérrez, T. y Vázquez, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr Vol. 42, N°2*, junio.
- Corrales, L. y Muñoz, M. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. Vol. 10 No. 18* Julio - Diciembre: 135 – 250
- Correa, D., (2015). *Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos acuosos de Curcuma (longa linn), aplicados en la elaboración de salsa de tomate, Machala 2014*. (Tesis de pregrado). Universidad técnica de Machala, Colombia.
- Correa, M., Rodriguez, G., Marcowicz, D and Villavicencio A. (2018). Effect of gamma radiation processing on turmeric: Antioxidant activity and curcumin content. *Radiation Physics and Chemistry 152*: 12–16-
- D'Arrigo, E., Fernández, C., Olarte & Ramberg, K. (2018). "ESTUDIO DE PREFACTIBILIDAD PARA LA INSTALACIÓN DE UNA PLANTA PROCESADORA DE CÚRCUMA EN LA PROVINCIA DE LA CONVENCIÓN, CUSCO". (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.
- Delgado, L., Betanzos, G. y Sumaya, Ma. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguas Calientes. Número 50*, (10-15) Septiembre-Diciembre.

- Devaraj, S., Ismail, S., Ramanathan, S., & Yam, M. F. (2014). Investigation of Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Standardized Curcuma xanthorrhiza Rhizome in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damaged Rats. *The Scientific World Journal*, 1–8
- Di Meo, S., Reed, T., Venditti, P., & Victor, V. (2016). Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2016, Article ID 1245049, 44 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1245049>
- Dos Santos, Sousa, Silveira, Folgaroli, Cardoso, Andrade-Vieira & Resende (2018). Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. *Environ Sci Pollut Res*. <https://doi-org.ezproxybib.pucp.edu.pe/10.1007/s11356-017-1015-x>
- Durand, M. y Mach, N. (2013). El ácido alfa lipoico y su poder antioxidante frente al cáncer y las patologías de sensibilización central. *Nutr Hosp*. 2013; 28(4):1031-1038.
- Farnsworth, N., Akerete, O., Bengel, A., Suejanto, D. & Guo, Z. (1990). Las plantas medicinales en la terapéutica. *Bol Of Sanit Panam* 1989;107 (4):4314-29.
- Freire-González, M. y Vistel-Vigo, M. (2015). Caracterización fitoquímica de la *Curcuma longa* L. *Rev. Cubana Quím*. Vol. 27, No. 1, enero-abril, págs. 9-18
- Forouzandeh, H., Kalantari, H., Saki, N., Forouzandeh, Z., Arefian, E., Farahani, A., Hassani, G., Bazrafshan, M. y Rasouli, S. (2017). Role of oxidative stress in liver cancer. *Clin Cancer Investig J*; 6:1-9
- Fuchs, A. (2008). Tratamiento y post-tratamiento con Isonidamina en la línea celular de carcinoma colonico humano HT-29. *MEDICINA - Volumen 68* - Nº 1, 13-22.
- Garcia, B., Saldaña, A. y Saldaña, L. (2012). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista habanera de Ciencias Médicas* 12(2), 187-196.
- González-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R., Lavandera, J., Alkorta, I. & Elguero, J. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural

- studies and biological Properties. *An Real Acad Farm Vol. 81*, Nº 4 (2015), pp. 278-310
- Guerreiro, N. & Dinis-Oliveira, R. (2018). Drugs of abuse from a different toxicological perspective: an updated review of cocaine genotoxicity. *Archives of Toxicology*; 92:2987–3006.
- Gülcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol*; 86:345–391
- Hernández, G. (2016). *Actividad antiproliferativa de antocianinas de tortilla de maíz azul de las razas mixteco, bolita y chalqueño sobre la línea celular de cáncer de próstata DU145*. (Tesis maestría). Universidad Veracruzana. Xalapa. México.
- Hong, J., Ahn, K., Bae, K., Jeon, S. and Choi, H. et al (2006). The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 9: 147–152
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A. y Armand, R. (2015) La aplicación de plantas medicinales en la medicina tradicional y moderna: una revisión de *Thymus vulgaris*. *Revista Internacional de Medicina Clínica*, 6, 635-642. doi: [10.4236/ijcm.2015.69084](https://doi.org/10.4236/ijcm.2015.69084) .
- INEN. (2016). Registro de Cáncer de Lima Metropolitana Incidencia y Mortalidad 2010 – 2012. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas “Dr. Eduardo Cáceres Graziani”. Departamento de Epidemiología y Estadística del Cáncer.
- Isil, K., Demirata, B. & Apak R. (2012). Determination of Total Antioxidant Capacity of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants In the Same Solution by Using Ferric–Ferricyanide Assay. *Food Anal. Methods* (2012) 5:1150–1158 DOI 10.1007/s12161-011-9358-2
- Janiak, M., Suska, M., Dudzin´ ska, W. and Skotnicka E. (2010). Blood glutathione status and activity of glutathione-metabolizing antioxidant enzymes in erythrocytes of young trotters in basic training. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 94:137–145
- Jiménez, B. (1994). Epistemología y métodos de las ciencias. Perfiles Educativos, núm. 63, enero-marz, Instituto de Investigaciones sobre la Universidad y la Educación. Distrito Federal, México

- Kadri, Y., Nciri, R., Brahmi, N., Saidi, S., Halim, A., Alwasel, S..... Salah, M. (2018). Protective effects of *Curcuma longa* against neurobehavioral and neurochemical damage caused by cerium chloride in mice. *Environmental Science and Pollution Research* (2018) 25:19555–19565 <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2151-7>
- Kapinova, A., Kubatka, P., Golubnitschaja, O., Kello, M., Zubor, P., Solar, P. and Pec, M. (2018). Dietary phytochemicals in breast cancer research: anticancer effects and potential utility for effective chemoprevention. *Environmental Health and Preventive Medicine* (2018) 23:36
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L. & Hocevar, B. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicology Pathology*, 38: 96-109
- Kryston, T., Georgiev, A., Pissis, P. & Georgakilas, A. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 711:193-201
- Kuete, V., Seo, E., Krusche, B., Oswald, M., Wiench, B., Schröder,..... Efferth, T. (2013). Cytotoxicity and Pharmacogenomics of Medicinal Plants from Traditional Korean Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2013, Article ID 341724, 14 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/341724>
- Kunwar, A. and Priyadarsini k. (2011). Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Allied Sci*; 1(2).
- Kyoung, T., An, T., Rak, S., Kim, S., Min, H., Moon, E.....Kim, K. (2019). Bioactivity-based analysis and chemical characterization of antiinflammatory compounds from *Curcuma zedoaria* rhizomes using LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Bioorganic Chemistry* 82: 26–32
- Lekshmi, P., Arimboor, R., Nisha, V., Nirmala, A. & Raghu, K. (2014). In vitro antidiabetic and inhibitory potential of turmeric (*Curcuma longa* L) rhizome against cellular and LDL oxidation and angiotensin converting enzyme. *J Food Sci Technol* (December 2014) 51(12):3910–3917 DOI 10.1007/s13197-013-0953-7
- León, C., Ysabel, A., Pimentel, J., Yanire, A., Sánchez, L., Isabel, D..... Celso A. (2016). ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE

- Alternanthera mexicana* EN LAS LÍNEAS CELULARES 3T3 Y HUTU 80. *REVISTA PERUANA DE MEDICINA INTEGRATIVA*; 1(2):5-11
- Liang, N. & Kitts, D. (2014). Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19: 19180-19208. Doi: 10.3390/molecules191119180
- Lock De Ugaz O. (2016). *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. Lima, Perú. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
- López A., Fernando, C., Lazarova, Z., Bañuelos, R. & Sánchez R. (2012). Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM. VOL.6 N°1*.
- Macedo-Márquez, Alain. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2):97-103
- Marguina, D., Tudorel, O., Ilie, M., Grădinaru, D., Guțu, C., Voicu, S.....Tsatsakis, A. (2015). Assessment of the potential health benefits of certain total extracts from *Vitis vinifera*, *Aesculus hyppocastanum* and *Curcuma longa*. *Experimental and Therapeutic Medicine* 10: 1681-1688. DOI: 10.3892/etm.2015.2724
- Marotte, C. and Zeni, S. (2013). Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 47 (4): 661-74.
- Martínez-Carpio, P. y Navarro, M. (2003). El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Rev Oncol*; 5(4):184-91
- Mayor-Oxilia, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Rev. Inst. Med. Trop.*; 5(2):23-29
- Mazidi, M., Karimi, E., Meydani, M., Ghayour-Mobarhan, M., & Ferns, G. A. (2016). Potential effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor- γ in vitro and in vivo. *World journal of methodology*, 6(1), 112–117. doi:10.5662/wjm.v6.i1.112
- Merentes, E. (2016). *Manual de de técnicas básicas del cultivo celular*. Caracas, Venezuela. Editorial Ediciencias-UCV.

- MINSA. (2018). *Situación epidemiológica del cáncer de acuerdo a la vigilancia epidemiológica de cáncer basada en registros hospitalarios. Enero-diciembre 2017*. Boletín epidemiológico del Perú Volumen 27 - SE 31. Recuperado de <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2018/05.pdf>
- Miranda, V. (2019). *Evaluación de la actividad antiproliferativa, antioxidante y antiinflamatoria in vitro del extracto metanólico de hojas de Piper aduncum, Buddleja incana y Dracontium spruceanum*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Miranda, T. (2017). Método Tomasevich: para determinar el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos. En I. Lares-Asself. 2° Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Octubre 25 al 28 del 2017. Congreso llevado a cabo en Durando, Dgo., México.
- Moneo, M. (2009). *Generación de herramientas celulares para validación preclínica de compuestos anti-tumorales*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. España.
- Muñoz-Bernal, J., Torres-Aguirre, G., Núñez-Gastélum, J., de la Rosa, L., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 20(2): 23-28.
- Nahak, G. & Kanta, R. (2011). Evaluation of antioxidant activity in ethanolic extracts of five curcuma species. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(12).
- Nakai, Y. & Nonomura, N. (2013). Inflammation and prostate carcinogenesis. *International Journal of Urology* 20, 150–160.
- Nita, M. & Grzybowski, A. (2016). The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2016*, Article ID 3164734, 23 pages.
- Öner-İyidoğan, Y., Tanrıku-Küçük, S., Seyithanoğlu, M., Koçak, H., Doğru-Abbasoğlu, S., Aydın, A. F.....Koçak-Toker, N. (2014). Effect of

- curcumin on hepatic heme oxygenase 1 expression in high fat diet fed rats: is there a triangular relationship? *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 92(10), 805–812.
- Peñaloza J., & Rojano B. (2014). Potenciación de la capacidad antioxidante mediante interacción sinérgica entre bioactivos de frutas nativas colombianas. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol 23, No 33.
- Pham-Huy, L., He, H. & Pham-Huy, Ch. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci Vol. 4* No. 2 June.
- Priya, S., Sangilimuthu, A., karpagavalli, M., Ramkumar, M., Josphin, A. (2017). Antioxidant potential and simultaneous estimation of quercetin, rutin, and gallic acid in *curcuma* species. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 10, Issue 12, 387-391
- Qadir, M., Naqvi, S., & Muhammad, S. (2016). Curcumin: a Polyphenol with Molecular Targets for Cancer Control. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol 17.
- Quispe A., Zavala D., Posso M., Rojas J. y Vaisberg A. Efecto citotóxico de *Annona muricata* (guanabana) en cultivo de líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. *CIMEL 2007 Vol. 12* N° 1
- Rajesh, H., Rao, S., Megha, R., Prathima, K., Rejeesh, E. & Chandrashekar, R. (2013). Phytochemical analysis of Methanolic extract of *Curcuma longa* Linn. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences* 2(2): March-April
- Ramón, G. (2016). Diseños experimentales Apuntes de clase del curso Seminario Investigativo VI. Recuperado el 03 de julio del 2019.de <http://bibliotecas.unam.mx/index.php/desarrollo-de-habilidades-informativas/como-hacer-citas-y-referencias-en-formato-apa>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.*; 26: 1231-7.
- Ríos-Arrabal, S., Artacho-Cordón, F., León, J., Román-Marinetto, E., Salinas-Asensio, M., Calvente, I. and Núñez, M. (2013). Involvement of free radicals in breast cáncer. *SpringerPlus*, 2:404

- Roberts S., Klots L., Kehrer J., *Studies on Experimental Toxicology and Pharmacology*. Springer International Publishing Switzerland 2015. Humana Press, Cham. Recuperado de <https://link.springer.com/book/10.1007%2F978-3-319-19096-9>
- Rodríguez, T., Peña, M., Gómez, N., Lozano, S. & Hernández, M. (2015). Estrés oxidativo: genética, dieta y desarrollo de enfermedades. *CCM*; 19 (4)
- Roehrs, M., Valentini, J., Paniz, C., Moro, A., Charão, M., Bulcão, R.....Garcia, S. (2011). The relationships between exogenous and endogenous antioxidants with the lipid profile and oxidative damage in hemodialysis patients. *BMC Nephrology*, 12:59
- Sahari, M. & Berenji, S. (2015). Bio-antioxidants Activity: Their Mechanisms and Measurement Methods. *Appl Food Biotechnol*, Vol. 2, No. 1
- Sahebkar A. (2012). Why it is Necessary to Translate Curcumin Into Clinical Practice for the Prevention and Treatment of Metabolic Syndrome? *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 39*, Number 2, March/April 2013, Pages 197–208.
- Saiz de Cos (2014). Curcuma I (*Curcuma longa* L.). *Reduca (Biología). Serie Botánica*. 7 (2): 84-99.
- Sánchez, Catherine (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer. *Rev. Med. Clin. CONDES*; 24-4: 553-562
- Serairi Beji, R., Ben Mansour, R., Bettaieb Rebey, I., Aidi Wannes, W., Jameleddine, S., Hammami, M., Ksouri, R. (2018). Does *Curcuma longa* root powder have an effect against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats: a protective and curative approach. *Food Science and Biotechnology*. Doi: 10.1007/s10068-018-0449-3
- Siegel, R., Miller, K. and Jemal, A. (2017). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan 5 Published online 2017 Jan 5. doi: 10.3322/caac.21387.
- Sirisidthi, K., Kosai, P., Jiraungkoorskul, K. and Jiraungkoorskul, W. (2016). Antithrombotic activity of turmeric (*Curcuma longa*): A review. *Indian J. Agric. Res.*, 50 (2) 2016: 101-106.
- Skejan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D..... Boyd, M. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for

- Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 82, No. 13, July 4,
- Srivastava, S., Saksena, A., Khattri, S., Kumar, S., & Dagur, R. (2016). *Curcuma longa* extract reduces inflammatory and oxidative stress biomarkers in osteoarthritis of knee: a four-month, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Inflammopharmacol* 24:377–388.
- Sumitha, K. & Thoppil, J. (2016). Genotoxicity assessment of two common curing weeds: *Hyptis suaveolens* (L.) Poir. and *Leucas indica* (L.) R. Br. *Cytotechnology* 68:1513–1527. DOI 10.1007/s10616-015-9911-8
- Tanvir, E., Hossen, M., Hossain, M., Afroz, R., Gan, S., Khalil, M., & Karim, N. (2017). Antioxidant Properties of Popular Turmeric (*Curcuma longa*) Varieties from Bangladesh. *Journal of Food Quality*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/8471785>
- Tegeli, V., Karpe, P. and Katve, V. (2014). Importance of free radical and antioxidant on human health. *IJPCBS*, 4(4), 1038-1050
- Tiveron, A., Melo, P., Bergamaschi, K., Vieira, T., Regitano-d'Arce, M., & Alencar, S. (2012). Antioxidant Activity of Brazilian Vegetables and Its Relation with Phenolic Composition. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 8943-8957
- Tume, L. (2017). *Fraccionamiento guiado por bioensayo e identificación de blancos moleculares de potencial acción antipsicótica de cuatro plantas medicinales peruanas*. (Tesis maestría). Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima. Perú.
- Udensi, K. & Tchounwou, P. (2016). Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35:139
- Ullah, M., Bhat, S., Husain, E., Abu-Duhier, F., Hadi, S., Sarkar, F., & Ahmad, A. (2014). Cancer chemopreventive pharmacology of phytochemicals derived from plants of dietary and non-dietary origin: implication for alternative and complementary approaches. *Phytochemistry Reviews*, 13(4), 811–833.
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112–1116. doi:10.1038/nprot.2006.179

- Villa, N., Moreno, W. y Cevallos, A. (2008). Activity of glutathione peroxydase and superoxide dismutase in whole blood, blood plasma and seminal plasma in normande Bulls. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2008; 21:537-545
- Villalta, K., & García, J. (2017). *Efecto anticoagulante in vitro del extracto etanólico del rizoma de Curcuma longa L. "palillo" en muestras sanguíneas de mujeres jóvenes*. (Tesis de pregrado). Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo, Perú.
- Yadav, S., Kumbhar, N., Jan, R., Roy, R., & Satsangi, P. (2018). Genotoxic effects of PM10 and PM2.5 bound metals: metal bioaccessibility, free radical generation, and role of iron. *Environ Geochem Health*. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0199-4>
- Yasmeen, H. and Hassnain, S. (2016). Comparative analysis of different bioactivities of *Curcuma longa*, *Nigella sativa* Seeds, and *Camellia sinensis* extracted by four different methods: a green way to reduce oxidative stress. *Food Sci. Biotechnol.* 25(3): 811-819. DOI 10.1007/s10068-016-0136-1
- Yue, G., Jiang, L., Kwok, H., Lee, J., Chan, K., Fung, K., Leung, P. & Lau, C. B.-S. (2016). Turmeric ethanolic extract possesses stronger inhibitory activities on colon tumour growth than curcumin – The importance of turmerones. *Journal of Functional Foods* 22: 565–577
- Zamora J. (2007). Antioxidantes: micronutrientes en lucha por la salud. *Revista Chilena de Nutrición*, Vol. 34, Núm. 1, marzo

ANEXOS

Anexo 1.

César A. Grandez Ríos
CONSULTOR BOTANICO
C.B.P. N° 3052
TELF. 949028730

CERTIFICACION BOTANICA

César A. Grandez Ríos; Biólogo con N° de Colegiatura N° 3052; con aprobación del Ministerio de Agricultura, Inscrito en el Registro de Profesionales que realiza Certificaciones e Identificaciones de especímenes en Productos de Flora y Fauna Silvestre- con Resolución Directoral N° 85-2013-AG-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, la planta presentada a la vista por la Dra. Martha Francisca Cosquillo Rafael, Conocida comúnmente como "curcuma" ha sido identificad taxonómicamente como se indica.

Clase Equisetopsida

Sub-Clase. Magnoliidae

Super Orden. Liliales


Orden. Zingiberales

Familia. Zingiberaceae

Genero. Curcuma

Especie. longa. Linneo

Se expide la presente certificación para los fines que estime conveniente



BLGO. CESAR A. GRANDEZ RIOS
PROF. ASOCIADO FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
UNAP-IQUITOS
DNI. 05295541

**Anexo 2. Coeficiente de Correlación de Pearson (r) del extracto crudo
Cúrcuma longa L.-DPPH**

		Correlaciones	
		%_Capacidad Antioxidante	Concentración _Fenoles
%_Capacidad Antioxidante	Correlación de Pearson	1	,993**
	Sig. (bilateral)		,001
	N	5	5
Concentración _Fenoles	Correlación de Pearson	,993**	1
	Sig. (bilateral)	,001	
	N	5	5

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

**Anexo 3. Coeficiente de Correlación de Pearson (r) del extracto
etanólico *Cúrcuma longa* L.-DPPH**

		Correlaciones	
		%_Capacidad Antioxidante	Concentración _Fenoles
%_Capacidad Antioxidante	Correlación de Pearson	1	,995**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	5	5
Concentración _Fenoles	Correlación de Pearson	,995**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	5	5

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Anexo 4. Coeficiente de Correlación de Pearson (r) del extracto etanólico *Cúrcuma longa* L.-ABTS

		Correlaciones	
		%_Capacidad Antioxidante	Concentración _Fenoles
%_Capacidad Antioxidante	Correlación de Pearson	1	,960**
	Sig. (bilateral)		,010
	N	5	5
Concentración _Fenoles	Correlación de Pearson	,960**	1
	Sig. (bilateral)	,010	
	N	5	5

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Anexo 5. Coeficiente de Correlación de Pearson (r) del extracto crudo *Cúrcuma longa* L.-ABTS

		Correlaciones	
		%_Capacidad Antioxidante	Concentración _Fenoles
%_Capacidad Antioxidante	Correlación de Pearson	1	,999**
	Sig. (bilateral)		,000
	N	5	5
Concentración _Fenoles	Correlación de Pearson	,999**	1
	Sig. (bilateral)	,000	
	N	5	5

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

ANEXO 6. Prueba de Kruskal-Wallis: Grado de genotoxicidad (fragmentación) vs. Concentración en mg/mL. para el extracto crudo.
Estadísticas descriptivas

Concentración en mg/mL.	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
5	4	0	4,5	-2,48
10	4	0	4,5	-2,48
25	4	1	10,5	-0,62
50	4	3	16,5	1,24
100	4	3	16,5	1,24
200	4	4	22,5	3,10
General	24		12,5	

Prueba

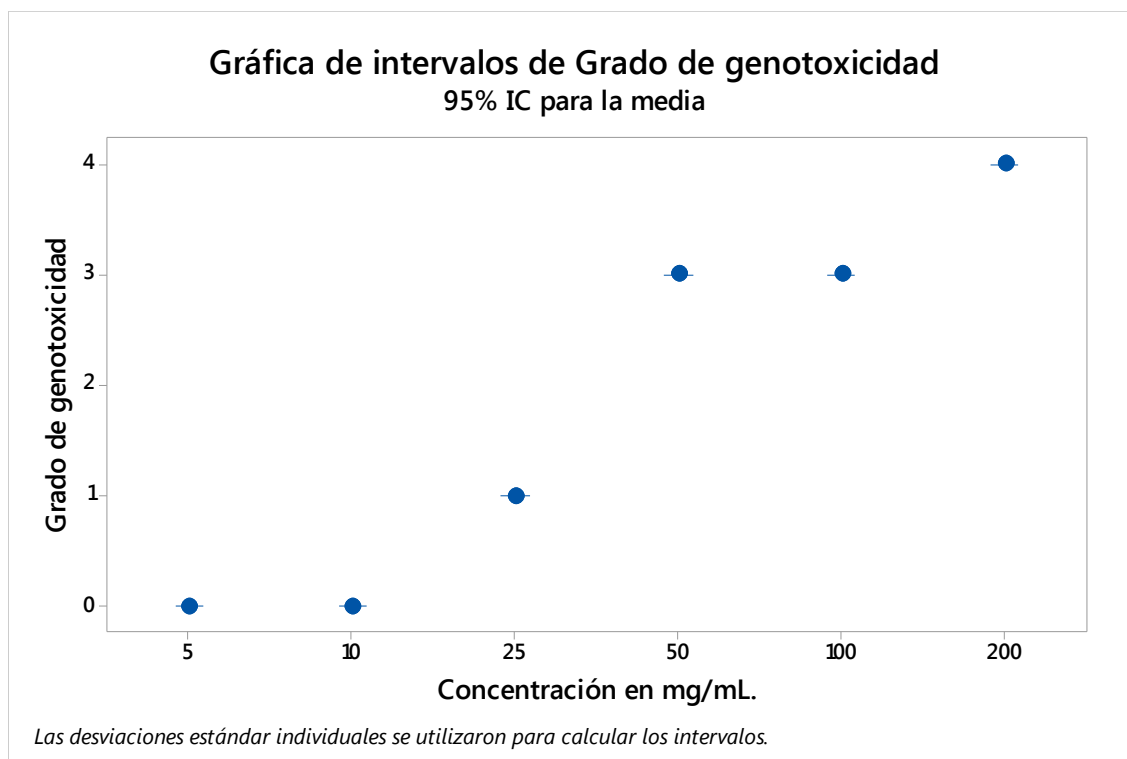
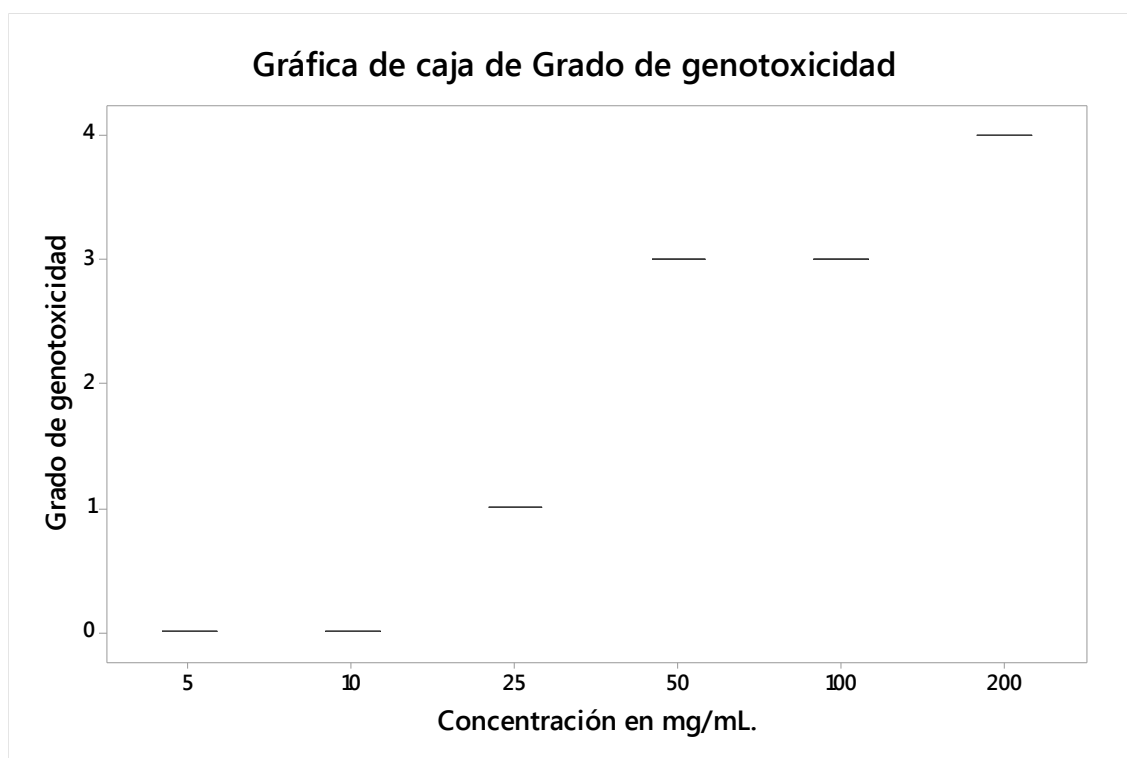
Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Tabla 2

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	5	21,12	0,001
Ajustado para empates	5	23,00	0,000

La aproximación de chi-cuadrada podría no ser exacta cuando algunos tamaños de muestra sean menores que 5.



ANEXO 7. Prueba de Kruskal-Wallis: Grado de genotoxicidad (fragmentación) vs. Concentración en mg/mL. para el extracto etanólico, Estadísticas descriptivas.

Concentración en mg/mL.	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
5	4	0	2,5	-3,10
10	4	0	6,5	-1,86
25	4	0	10,5	-0,62
50	4	0	14,5	0,62
100	4	0	18,5	1,86
200	4	0	22,5	3,10
General	24		12,5	

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

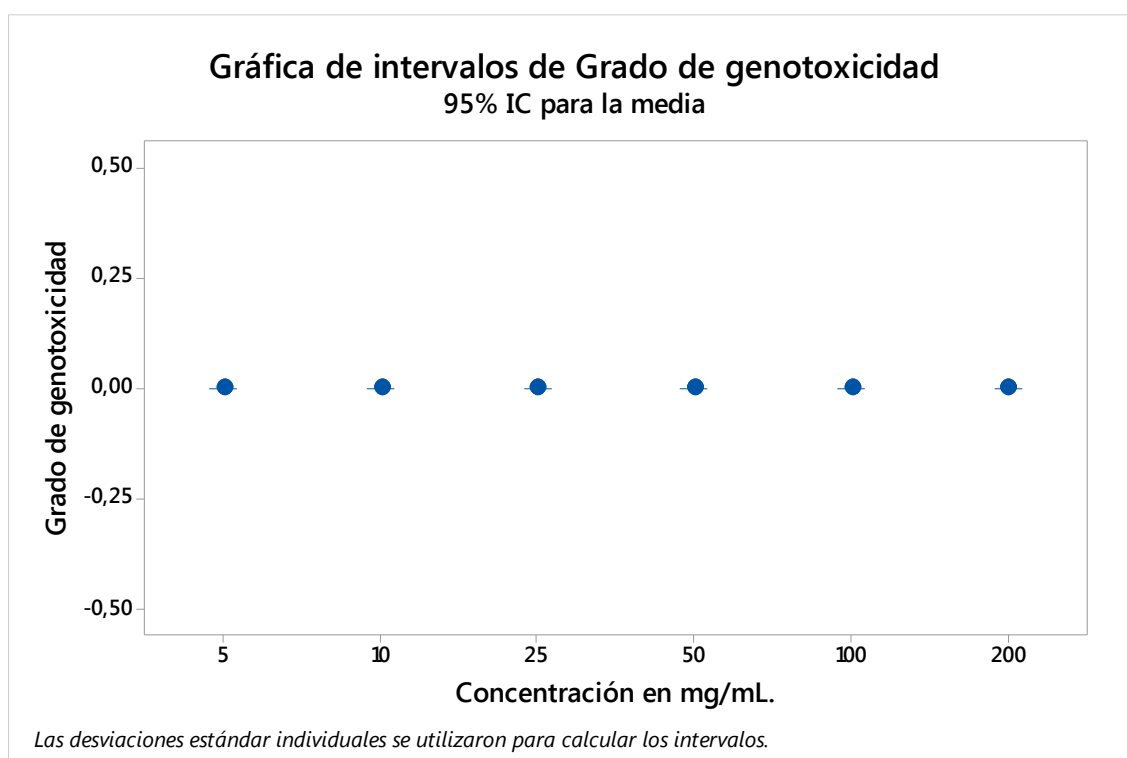
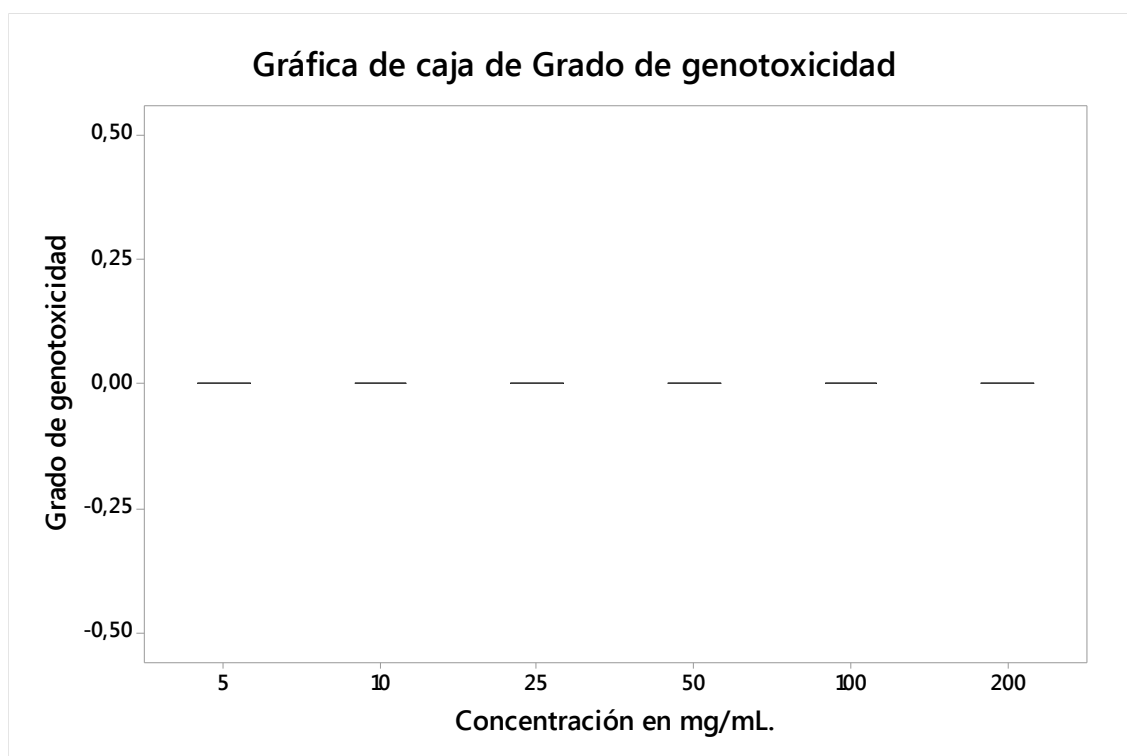
Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Tabla 4

GL	Valor H	Valor p
5	22,40	0,000

SOLO INDICAR QUE NO HUBO EFECTO

La aproximación de chi-cuadrada podría no ser exacta cuando algunos tamaños de muestra sean menores que 5.



ANEXO 8. Prueba de Kruskal-Wallis: Grado de genotoxicidad (fragmentación) vs. Concentración en mg/mL. para estándar curcumina. Estadísticas descriptivas.

Concentración en mg/mL.	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
5	4	0	10,5	-0,62
10	4	0	10,5	-0,62
25	4	0	10,5	-0,62
50	4	0	10,5	-0,62
100	4	0	10,5	-0,62
200	4	1	22,5	3,10
General	24		12,5	

Prueba

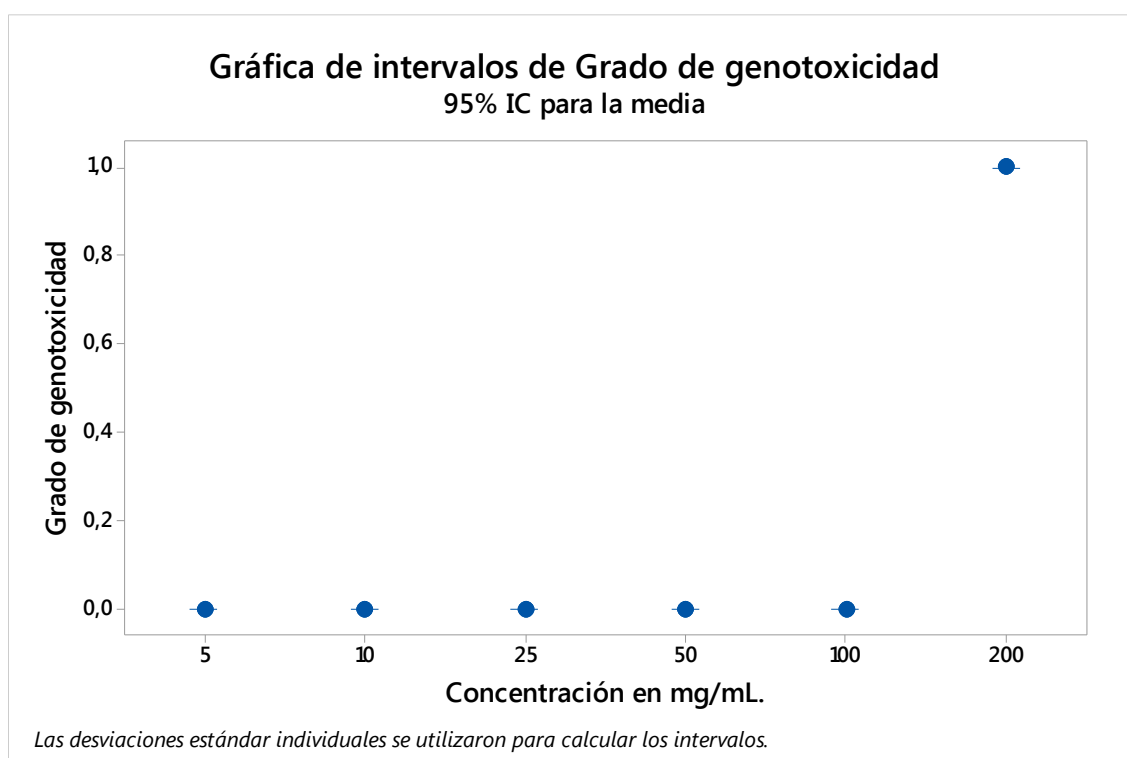
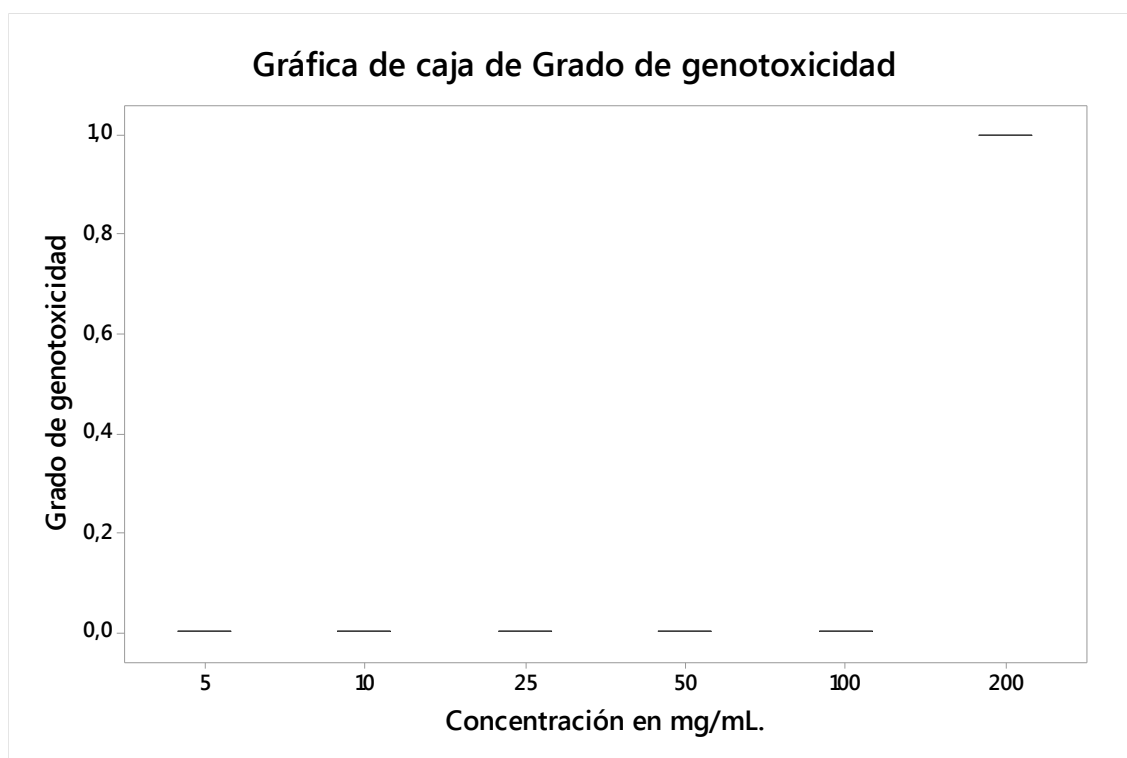
Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Tabla 6

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	5	9,60	0,087
Ajustado para empates	5	23,00	0,000

La aproximación de chi-cuadrada podría no ser exacta cuando algunos tamaños de muestra sean menores que 5.



Anexo 5. Preparación del extracto etanólico y crudo del rizoma de *Curcuma longa* L.



Rizoma entero de *Curcuma longa* L.



Molienda del rizoma



Filtración del extracto
luego de maceración



Equipo para obtener extracto
crudo del rizoma

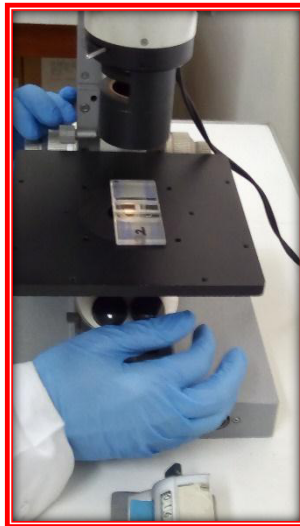


Extracto seco crudo del rizoma



Extracto seco etanólico del
rizoma

Anexo 6. Estudio antitumoral sobre la línea celular 3T3 (fibroblastos normales de ratón), HT-29 (carcinoma de colon) y DU-145 (adenocarcinoma de próstata humano):



Conteo de células con
Microscopio invertido



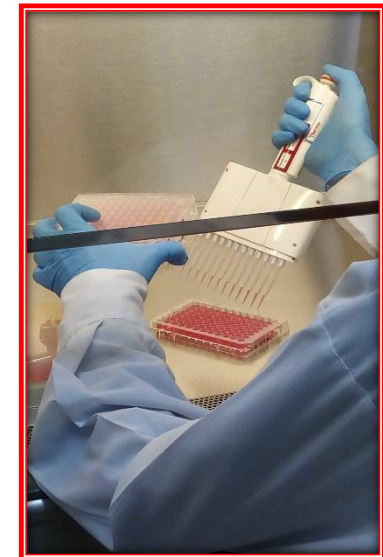
Células HT-29 en
medio de cultivo



Se trabajó en cámara de flujo laminar las líneas celulares



Método SRB.
Lectura en
lector ELISA
Ibo-Rad
modelo 450.



Anexo 7. Estudio de genotoxicidad en AND genómico de linfocito humano



Diferentes concentraciones del extracto de *Curcuma longa* L.



Nivelando agar para cámara de electroforesis



Carga de muestras en Equipo de electroforesis

Radiación UV para visualización de genotoxicidad



Corrida final del gel de agarosa

